

VINÍCIUS DE MARIA GADOTTI

ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTINOCICEPTIVA DA
AGMATINA EM CAMUNDONGOS

Florianópolis-SC

2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTINOCICEPTIVA DA
AGMATINA EM CAMUNDONGOS

VINÍCIUS DE MARIA GADOTTI

Florianópolis-SC

2005

ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTINOCICEPTIVA DA
AGMATINA EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Santa Catarina como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Florianópolis, 2005.

*“... Não deixe que a saudade sufoque,
que a rotina acomode,
que o medo impeça de tentar.
Desconfie do destino e acredite em você.
Gaste mais horas realizando que sonhando,
fazendo que planejando,
vivendo que esperando porque,
embora quem quase morre esteja vivo,
quem quase vive já morreu..”*

(Luís Fernando Veríssimo)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por iluminar meu caminho, por dar-me saúde e principalmente pela oportunidade de viver.

Aos meus pais Osmar e Vera, meus maiores mestres e incentivadores.

Ao professor e amigo Dr. Adair Roberto Soares dos Santos pela orientação, incentivo e confiança em todos os momentos, pela oportunidade e por fornecer condições para a realização deste e de outros trabalhos em seu laboratório, pelo exemplo de perseverança incansável ao ensino e a ciência.

À professora Dra. Ana Lúcia Severo Rodrigues pela amizade, auxílio e ensinamentos.

À minha namorada Manuella por ter sido minha grande companheira em todos os momentos durante esta jornada, por entender a minha ausência em muitas horas e pelo apoio constante.

A todos os colegas do laboratório, especialmente à Ana Flávia Paszcuk e Daiane Tibola que ajudaram em grande parte dos experimentos deste trabalho.

Ao Nivaldo, secretário da pós-graduação, pela atenção e competência em todos os momentos.

Aos docentes do curso de pós-graduação em Neurociências da UFSC pelos ensinamentos.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Agradeço também a todos aqueles que infelizmente não foram citados, mas que foram importantes de maneira direta ou indireta na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	i
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	v
Resumo	vi
Summary	viii
1. Introdução	1
1.1 Agmatina	1
1.2 Dor	8
2. Objetivos	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3. Materiais	19
3.1 Animais	19
3.2 Drogas e Reagentes	19
4. Metodologia	21
4.1 Testes Comportamentais	21
4.1.1 Nocicepção induzida pelo ácido acético	21
4.1.2 Nocicepção induzida pela capsaicina	22
4.1.3 Nocicepção induzida pela formalina	22
4.1.4 Nocicepção induzida pelo glutamato	23
4.1.5 Avaliação da Atividade Locomotora: Teste do campo aberto	24
4.2 Análise do mecanismo de ação antinociceptiva da agmatina	25
4.2.1 Envolvimento da via da L-arginina-óxido nítrico	26
4.2.2 Envolvimento do sistema imidazólico	26

4.2.3 Envolvimento do sistema alfa(α) ₂ -adrenérgico	27
4.2.4 Envolvimento do sistema serotoninérgico	27
4.2.5 Envolvimento do sistema opióide	28
4.2.6 Envolvimento da proteína G _{i/o} sensível à toxina pertussis	28
4.2.7 Envolvimento dos canais de cálcio	29
4.2.8 Envolvimento das fibras C sensíveis à capsaicina	29
4.3 Análise Estatística	30
5. Resultados	31
5.1 Testes Comportamentais	31
5.1.1 Nocicepção induzida pelo ácido acético	31
5.1.2 Nocicepção induzida pela capsaicina	32
5.1.3 Nocicepção induzida pela formalina	33
5.1.4 Nocicepção induzida pelo glutamato	34
5.1.5 Avaliação da Atividade Locomotora: Teste do campo aberto	35
5.2 Análise do mecanismo de ação antinociceptiva da agmatina	36
5.2.1 Envolvimento da via da L-arginina-óxido nítrico	36
5.2.2 Envolvimento do sistema imidazólico	37
5.2.3 Envolvimento do sistema alfa(α) ₂ -adrenérgico	38
5.2.4 Envolvimento do sistema serotoninérgico	39
5.2.5 Envolvimento do sistema opióide	41
5.2.6 Envolvimento da proteína G _{i/o} sensível à toxina pertussis	42
5.2.7 Envolvimento dos canais de cálcio	43
5.2.8 Envolvimento das fibras C sensíveis à capsaicina	44
6. Discussão	45
7. Referências Bibliográficas	60
Anexos	79

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por cento
>	Maior que
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
°C	Graus Celsius
μ g	Microgramas
μ l	Microlitros
μ mol	Micromol
5-HT	Serotonina
5-HT ₁	Receptor serotoninérgico do subtipo 1
5-HT ₂	Receptor serotoninérgico do subtipo 2
5-HT ₃	Receptor serotoninérgico do subtipo 3
ADC	Arginina descarboxilase
AGs	Agonistas glutamatérgicos
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico
ATP	Trifostato de adenosina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CGRP	Peptídeo relacionada ao gene da calcitonina
DAG	Diacilglicerol
DI ₅₀	Dose inibitória em 50%
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis(β -aminoetil-éter)-N-N-N'-N'-tetraacético
E.P.M.	Erro padrão da média
g	Gramas
h	Horas
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
I ₁	Sítio de ligação imidazólico do subtipo 1
I ₂	Sítio de ligação imidazólico do subtipo 2
I ₃	Sítio de ligação imidazólico do subtipo 3
IL-1 β	Interleucina 1-beta
IL-6	Interleucina 6
kg	Quilogramas
i.c.v.	Intracerebroventricular

IM	Inibição máxima
IP ₃	Inositoltrifosfato
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
i.t.	Intratecal
L-NOARG	N ^ω -nitro-L-arginina
LHLR	Hormônio liberador do hormônio luteinizante
MAO	Monoamina oxidase
m/s	Metros por segundo
mg	Miligramas
min	Minutos
MK-801	(5 <i>S</i> ,10 <i>R</i>)-(+)-5-Metil-10,11-dihidro-5 <i>H</i> -dibenzo[a,d]
ml	Mililitros
mm	Milímetros
Na ⁺	Íons sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NGF	Fator de crescimento neuronal
NKA	Neurocinina A
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartico
ng	Nanogramas
nmol	Nanomol
NO	Óxido nítrico
NOS	Sintase do óxido nítrico
NPY	Neuropeptideo Y
OCT ₂	Transportador de cátions orgânicos 2
ODC	Ornitina descarboxilase
EMT	Transportador extra-neuronal de monoaminas
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
pmol	Picomol
PCPA	DL-p-clorofenilalanina-metil-éster
s.c.	Subcutânea
SNC	Sistema nervoso central
SP	Substância P
trans-ACPD	Ácido (±)-1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
v.o.	Via oral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural da agmatina	1
Figura 2: Metabolismo da L-arginina em mamíferos	5
Figura 3: Diferentes tipos de neurônios sensoriais primários	12
Figura 4: Fatores responsáveis pela ativação de nociceptores periféricos	14
Figura 5: Esquema de tratamento dos animais na realização dos experimentos de mecanismos e ação no modelo do ácido acético	25
Figura 6: Efeito antinociceptivo da agmatina administrada pela via i.p. ou v.o. no modelo do ácido acético (0,6%)	31
Figura 7: Efeito antinociceptivo tempo-dependente da agmatina administrada pela via i.p. no modelo do ácido acético (0,6%)	32
Figura 8: Efeito antinociceptivo da agmatina administrada pela via i.p. no modelo da capsaicina (1,6 µg/i.pl.)	32
Figura 9: Efeito antinociceptivo da agmatina administrada pela via i.p. no modelo da formalina (2,5%)	33
Figura 10: Efeito antinociceptivo tempo-dependente da agmatina administrada pela via i.p. no modelo da formalina (2,5%)	34
Figura 11: Efeito antinociceptivo da agmatina administrada pela via i.p. no modelo do glutamato (10 µmol/i.pl.)	34
Figura 12: Influência do pré-tratamento L-arginina ou D-arginina sobre o efeito antinociceptivo da agmatina no modelo do ácido acético	36
Figura 13: Influência do pré-tratamento com efaroxan ou idazoxan sobre o efeito antinociceptivo da agmatina no modelo do ácido acético	37
Figura 14: Influência do pré-tratamento com ioimbina sobre o efeito antinociceptivo da agmatina no modelo do ácido acético	38
Figura 15: Influência do pré-tratamento com PCPA sobre o efeito antinociceptivo da agmatina no modelo do ácido acético	39
Figura 16: Influência do pré-tratamento com pindolol, cetanserina ou ondansetron sobre o efeito antinociceptivo da agmatina no modelo do ácido acético	40

Figura 17: Influência do pré-tratamento com naloxona sobre o efeito antinociceptivo da agmatina no modelo do ácido acético	41
Figura 18: Influência do pré-tratamento com toxina pertussis sobre o efeito antinociceptivo da agmatina no modelo do ácido acético	42
Figura 19: Influência do pré-tratamento com CaCl_2 ou EGTA sobre o efeito antinociceptivo da agmatina no modelo do ácido acético	43
Figura 20: Influência do pré-tratamento neonatal com capsaicina sobre o efeito antinociceptivo da agmatina no modelo do ácido acético	44
Figura 21: Mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva da agmatina	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito do tratamento com agmatina ou clonidina administradas pela via i.p. sobre a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto	35
Tabela 2: Valores de DI_{50} e IM calculados para a agmatina nos diferentes modelos de nocicepção utilizados	35

RESUMO

O presente trabalho avaliou a atividade antinociceptiva da agmatina em diversos modelos comportamentais de nocicepção química, bem como alguns dos mecanismos envolvidos em sua ação antinociceptiva em camundongos. A agmatina (1-30 mg/kg), administrada pela via i.p., 30 min antes, causou inibição significativa e dependente da dose da nocicepção induzida pelo ácido acético com DI_{50} de 5,6 mg/kg. Quando administrada oralmente, 60 min antes, a agmatina (10-300 mg/kg) também inibiu de forma dependente da dose a nocicepção causada pelo ácido acético com DI_{50} de 147,3 mg/kg. A agmatina (3-100 mg/kg, i.p.) também inibiu de maneira significativa e dependente da dose a nocicepção induzida pela capsaicina e glutamato, com DI_{50} de 43,7 e 19,5 mg/kg, respectivamente. Além disso, a agmatina (1-100 mg/kg, i.p.) causou significativa inibição de ambas as fases da nocicepção causada pela formalina com valores de DI_{50} para as fases neurogênica e inflamatória de 13,7 e 5,6 mg/kg, respectivamente. A antinocicepção causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) no modelo do ácido acético foi significativamente revertida pelo pré-tratamento dos animais com L-arginina (precursor de óxido nítrico, 600 mg/kg, i.p.), naloxona (antagonista dos receptores opióides, 1 mg/kg, i.p.), PCPA (inibidor da síntese de serotonina, 100 mg/kg, i.p. por 4 dias consecutivos), cetanserina (antagonista dos receptores 5-HT_{2A}, 0,3 mg/kg, i.p.), ondansetron (antagonista dos receptores 5-HT₃, 0,5 mg/kg, i.p.), ioimbina (antagonista dos receptores α_2 -adrenérgico, 0,15 mg/kg, i.p.), efaroxan (antagonista dos receptores I₁ imidazólicos/ α_2 -adrenérgicos, 1 mg/kg, i.p.), toxina pertussis (inibidor da proteína G_{i/o}, 0,5 µg/i.t) ou por cloreto de cálcio (doador de íons Ca²⁺, 200 nmol/i.c.v.). No entanto, a antinocicepção produzida pela agmatina não foi afetada pelo pré-tratamento dos animais com pindolol (antagonista dos receptores 5-HT_{1A/1B}, 1 mg/kg) ou idazoxan

(antagonista dos receptores I_2 imidazólicos/ α_2 -adrenérgicos, 3 mg/kg). De maneira semelhante, a antinocicepção causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) não foi afetada pelo tratamento neonatal dos animais com capsaicina (50 mg/kg, s.c.). Assim, estes resultados indicam que a agmatina produz antinocicepção significativa e de forma dependente da dose em vários modelos de nocicepção por mecanismos que envolvem uma interação com os sistemas opióide, serotoninérgico (através dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT₃), α_2 -adrenérgico, imidazólico (através dos receptores I_1) com a via da L-arginina-óxido nítrico, bem como por uma interação com a proteína G_{i/o} sensível à toxina pertussis e canais de cálcio.

SUMMARY

The present study examined the antinociceptive effects of agmatine in chemical behavioral models of nociception and analysis several mechanisms involved in agmatine-induced antinociception in mice. Agmatine (1-30 mg/kg), given by i.p. route, 30 min earlier, produced dose-dependent inhibition of acetic acid-induced visceral pain, with mean ID₅₀ value of 5.6 mg/kg. Given orally, 60 min earlier, agmatine (10-300 mg/kg) also produced dose-related inhibition of the visceral pain caused by acetic acid, with mean ID₅₀ value of 147.3 mg/kg. Agmatine (3-100 mg/kg, i.p.) also caused significant and dose-dependent inhibition of capsaicin- and glutamate-induced nociception, with mean ID₅₀ values of 43.7 and 19.5 mg/kg, respectively. Moreover, agmatine (1-100 mg/kg, i.p.) caused marked inhibition of both phases of formalin-induced nociception, with mean ID₅₀ values for the neurogenic and the inflammatory phases of 13.7 and 5.6 mg/kg, respectively. The antinociception caused by agmatine in the acetic acid test was significantly attenuated by pre-treatment of mice with L-arginine (precursor of nitric oxide, 600 mg/kg, i.p.), naloxone (opioid receptor antagonist, 1 mg/kg, i.p.), PCPA (serotonin synthesis inhibitor, 100 mg/kg, i.p., once a day for four consecutive days), ketanserin (a 5-HT_{2A} receptor antagonist, 0.3 mg/kg), ondansetron (a 5-HT₃ receptor antagonist, 0.5 mg/kg), yohimbine (an α_2 -adrenoceptor antagonist, 0.15 mg/kg), efaroxan (an I₁ imidazoline/ α_2 -adrenoceptor antagonist, 1 mg/kg), pertussis toxin (G_{i/o}-protein inhibitor, 0.5 μ g/i.t) or by calcium chloride (Ca²⁺ donor, 200 nmol/i.c.v.). In contrast, agmatine antinociception was not affected by i.p. pre-treatment of animals with pindolol (a 5-HT_{1A/1B} receptor antagonist, 1 mg/kg) or idazoxan (an I₂ imidazoline/ α_2 -adrenoceptor antagonist, 3 mg/kg). Likewise, the antinociception caused by agmatine was not affected by neonatal pre-treatment with

capsaicin. Together, these results indicate that agmatine produces dose-related antinociception in several models of chemical nociception through mechanisms that involve an interaction with opioid, serotonergic (i.e., through 5-HT_{2A} and 5-HT₃ receptors), α_2 -adrenergic, imidazoline (i.e., through I₁ receptors) and nitrgergic systems, as well as via an interaction with G_{i/o} protein sensitive to pertussis toxin and calcium channels.

A maior parte destes resultados está sendo publicado em:

- **Gadotti VM**, Oliveira GL, Tibola D, Paszcuk AF, Neto A, Spindola HM, Sousa MM, Rodrigues ALS, Calixto JB, Santos ARS. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatina in mice. *Neuropharmacology*. 48 (2005) 1021-1034.

Outros trabalhos que foram desenvolvidos durante o curso de Mestrado que se encontram em preparação ou submetidos para publicação:

- Rosa KA; **Gadotti VM**, Rosa AO, Rodrigues ALS, Calixto JB, Santos ARS. Evidence for the involvement of glutamatergic system in the antinociceptive effect of ascorbic acid. *Neuroscience Letters*. No prelo.

- Rodrigues ALS, Rosa JM, **Gadotti VM**, Goulart EC, Santos MM, Silva AV, Sehnem B, Rosa LS, Gonçalves RM, Corrêa R, Santos ARS. Antidepressant and antinociceptive actions of 4-(4'-chlorophenyl)-6-(4''-methylphenyl)-2-hydrazinepyrimidine Mannich base in mice. Submetido à *Pharmacology Biochemistry and Behavior*.

- **Gadotti VM**, Schmeling LO, Machado C, Liz FH, Cechinel-Filho V, Meyre-Silva C, Santos ARS. Antinociceptive properties of methanolic extract and the isolated compound (Quercitrin) from barks of *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Leguminosae). Submetido à *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.

- **Gadotti VM**, Tibola D, Paszcuk AF, Rodrigues ALS, Calixto JB, Santos ARS. Involvement of metabotropic and NMDA ionotropic receptors in the antinociception caused by agmatine in mice. Em preparação.

- Paszcuk AF, **Gadotti VM**, Tibola D, Quintão NLM, Rodrigues ALS, Calixto JB, Santos ARS. Antinociceptive action of agmatine in several models of neuropathic and inflammatory chronic pain in mice. Em preparação.

1. INTRODUÇÃO

1.1 AGMATINA

A agmatina, apresentada sob fórmula estrutural na figura 1, é uma amina catiônica descoberta no início do século XX por Kossel

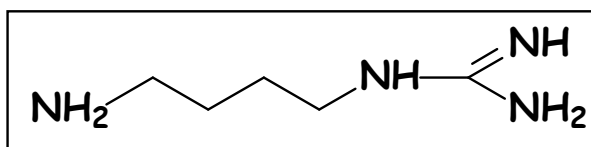


Figura 1: Fórmula estrutural da agmatina.

como um constituinte abundante de plantas e bactérias (TABOR e TABOR, 1984; REIS e REGUNATHAN, 2000; RAASCH et al., 2001). No entanto, em 1994, quando se tentava descobrir um ligante endógeno para os sítios imidazólicos, uma molécula candidata foi isolada do cérebro de mamíferos e identificada por espectroscopia como sendo a agmatina (LI et al., 1994; EGLIN et al., 1998; REIS e REGUNATHAN, 2000). A agmatina é sintetizada a partir de seu precursor, L-arginina, pela ação da enzima arginina descarboxilase (ADC) (Fig. 2), sendo que ambas, agmatina e ADC, são encontradas em bactérias, plantas, animais invertebrados e vertebrados (TABOR e TABOR, 1984; YAMAMOTO et al., 1988; LI et al., 1994). Além disso, várias isoformas da enzima ADC têm sido purificadas e clonadas nos diferentes organismos onde ela é encontrada, e apesar de algumas semelhanças e certa homologia, existem várias características que as diferenciam entre si, inclusive daquelas encontradas em humanos (WU e MORRIS, 1973; BELL e MALMBERG, 1990; MALMBERG e CELLINO, 1994; REIS e REGUNATHAN, 2000).

A agmatina foi identificada quimicamente por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) tanto no sistema nervoso central (SNC) quanto em órgãos periféricos de

mamíferos, tais como intestino, rins, estômago, vasos, pulmão, fígado, coração, glândula adrenal entre outros (RAASCH et al., 1995a,b, 2001; FENG et al., 1997). No entanto, a concentração de agmatina em todo SNC de ratos, representa aproximadamente 10% da agmatina encontrada no estômago, órgão que apresenta a maior concentração de agmatina (aproximadamente 71 ng/g de peso). Contudo, a concentração de agmatina em nível central é muito semelhante a dos neurotransmissores clássicos (RAASCH et al., 1995a,b; OTAKE et al., 1998; REIS e REGUNATHAN, 2000). Estudos de imunohistoquímica revelaram que a agmatina encontra-se abundantemente em neurônios, local onde ocorre sua síntese e armazenamento. No entanto, apesar dos astrócitos possuírem atividade da enzima ADC, o conteúdo de agmatina nestas estruturas é muito reduzido, provavelmente pelo fato que a agmatina não é armazenada nos astrócitos (REGUNATHAN et al., 1995; REIS et al., 1998; OTAKE et al., 1998; REIS e REGUNATHAN, 2000).

Os neurônios que contém agmatina estão localizados em regiões cerebrais relacionadas com o controle visceral e neuroendócrino, processamento das emoções, percepção da dor e cognição (REIS e REGUNATHAN, 2000). Neste sentido, através de técnica de imunohistoquímica, utilizando anticorpos específicos para a agmatina, foi demonstrado que ela está amplamente distribuída no cérebro de rato, principalmente no córtex cerebral, tronco encefálico, mesencéfalo, tálamo e hipotálamo (WANG et al, 1995; OTAKE et al., 1998). Além disso, a distribuição dos neurônios contendo agmatina relaciona-se com o padrão de distribuição dos receptores α_2 -adrenérgicos e os sítios de ligação imidazólicos, tendo em vista que (1) na maior parte das regiões, onde a agmatina está presente, também são expressos receptores α_2 -adrenérgicos e sítios de ligação imidazólicos (KAMISAKI et al., 1990; DE VOS et al., 1991, 1994; NICHOLAS et al., 1993, 1996; KING et al., 1995; RUGGIERO et al., 1995; RAASCH et al., 2001) e (2) os neurônios

agmatinérgicos são encontrados em regiões cerebrais nas quais se projetam para áreas que contém receptores α_2 -adrenérgicos e sítios de ligação imidazólicos (JONES e YANG, 1985; SAPER et al., 1986; BERENDSE e GROENEWEGEN 1991; RAASCH et al., 2001).

Os sítios imidazólicos são subdivididos em 3 grupos, baseados na sua distribuição e afinidade por ligantes. Tem sido proposto que os sítios de ligação imidazólicos, entre outras funções, exercem uma atividade importante em modular a dor e a depressão (BORONAT, et al., 1998; HALARIS e PILETZ, 2001). Os sítios imidazólicos I_1 estão localizados no córtex frontal e no bulbo ventrolateral, sendo que, estes sítios são os mais bem estudados tanto fisiologicamente quanto farmacologicamente. Entre outras funções, os sítios I_1 estão associados com a regulação central da pressão sangüínea. Os sítios imidazólicos I_2 são encontrados em vários tecidos, tais como cérebro, fígado, estômago e rim. Funcionalmente, estes sítios de ligação têm sido propostos com reguladores da atividade da monoamino oxidase (MAO). Neste sentido, Raasch e colaboradores (1999) demonstraram que o tratamento crônico com ligantes específicos para I_2 reduz a atividade da MAO em vários órgãos de rato. Os sítios imidazólicos I_3 foram os últimos a serem identificados e conseqüentemente os menos estudados até o momento, no entanto, parecem estar envolvidos na secreção de insulina pelas células β do pâncreas (MICHEL e ERNSBERGER, 1992; PARINI et al., 1996; EGLIN et al., 1998; RAASCH et al., 2001, HEAD, 2003).

Da mesma forma que os astrócitos, as demais células da glia também sintetizam agmatina, além disso, expressam os sítios imidazólicos. Com isso, pode-se sugerir que a agmatina sintetizada pelas células gliais é liberada para o espaço extracelular para subsequente transporte e armazenamento em neurônios (FENG et al., 1997; REIS e REGUNATHAN, 2000). Em concordância com esta hipótese, dados da literatura demonstram que a agmatina presente no espaço extracelular pode ser transportada e

armazena em neurônios (KUZIRIAN et al., 1986; SASTRE et al., 1997; GRÜNDEMANN et al., 2003). No entanto, em tecidos periféricos também existe uma dissociação entre síntese e armazenamento de agmatina, por exemplo, em vasos sanguíneos a agmatina é armazenada tanto nas células endoteliais quanto nas células da musculatura lisa vascular, mas apenas o endotélio expressa a enzima ADC. Assim, pode-se supor que a agmatina, pelo menos em vasos sanguíneos, é sintetizada no endotélio e posteriormente transportada e armazenada nas células do músculo liso vascular (REGUNATHAN et al., 1996).

Sastre e colaboradores (1997) propuseram que a agmatina, liberada por exocitose dependente de cálcio, é inativada em nível central por mecanismos dependentes da recaptação sinaptossomal, ainda não bem estudados. No entanto, Gründemann e colaboradores (2003) identificaram duas proteínas transportadoras não-neuronais para a agmatina: Transportador de cátion orgânico 2 (OCT2) e Transportador extra-neuronal de monoaminas (EMT), respectivamente em ratos e humanos. Estas proteínas apresentam eficiência, especificidade e transportam a agmatina de forma bidirecional através da membrana, sendo que, o transportador identificado em humanos demonstrou ser mais eficiente. Além do mecanismo de recaptação, a agmatina também pode ser inativada, em nível central, por um mecanismo de degradação enzimática por ação da enzima agmatinase, que a converte em putrescina como mostrado na figura 2. Além disso, a atividade da arginase, enzima que hidrolisa a L-arginina em ornitina e uréia, é dependente de agmatina (SASTRE et al., 1996, RAACH, 2001). A putrescina (Fig. 2) é precursor para a biossíntese das outras poliaminas (espermidina e espermina), sendo esta via presente em mamíferos por decorrência da ação da enzima ornitina descarboxilase (ODC) (REIS e REGUNATHAN, 2000).

Neste sentido, a agmatina preenche vários requisitos importantes para ser classificada como um neurotransmissor clássico, podendo assim ser enquadrada como um novo neurotransmissor/neuromodulador no SNC, pois ela: (1) possui uma enzima responsável por sua síntese e uma pela sua degradação; (2) é armazenada em vesículas e liberada mediante exocitose dependente de cálcio e (3) liga-se a alvos específicos (para revisão ver REIS e REGUNATHAN, 2000; RAASCH et al., 2001).

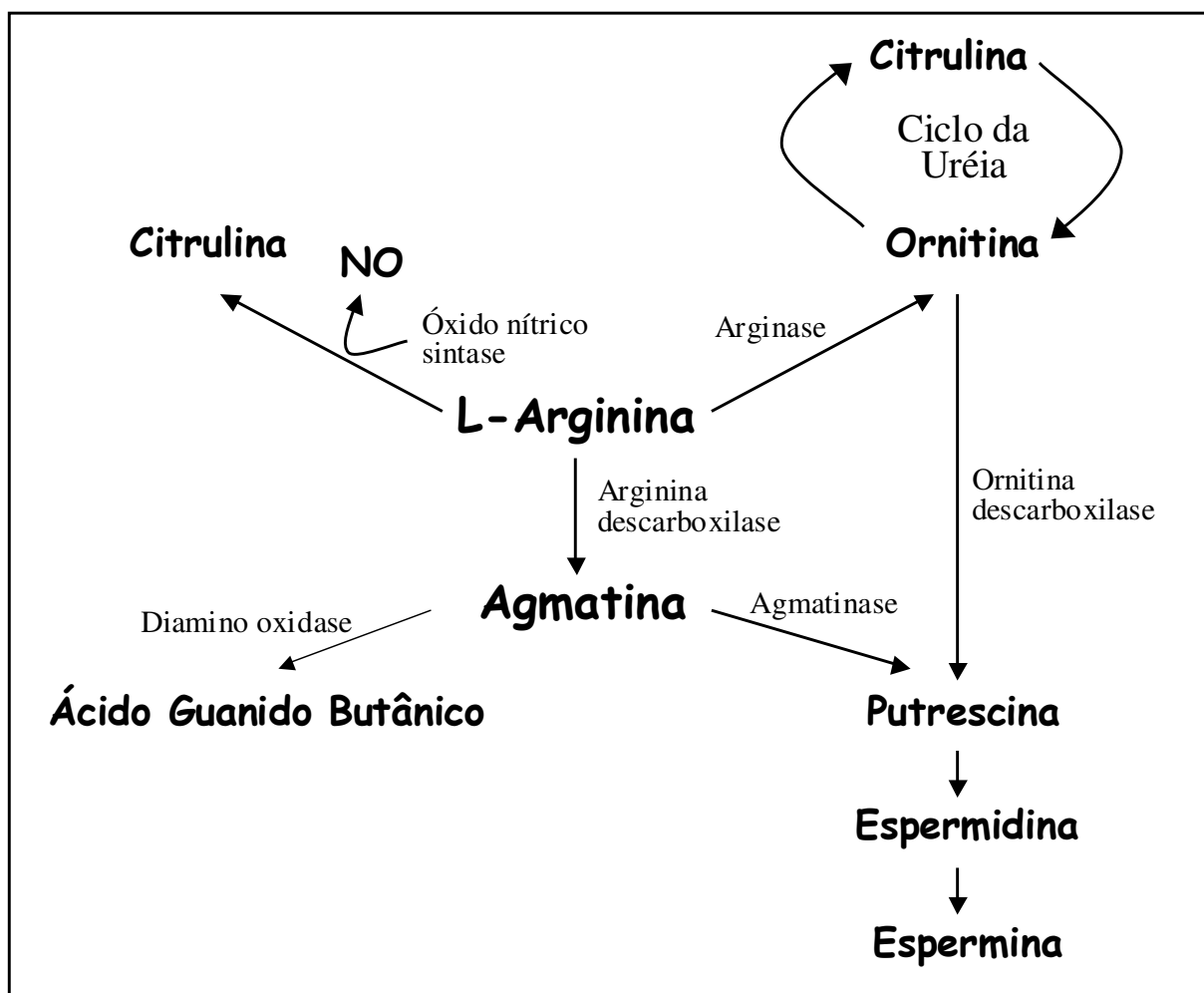


Figura 2: Metabolismo da L-arginina em mamíferos. Adaptado a partir de Reis e Regunathan, 2000 e Raasch et al., 2001.

É importante salientar que a agmatina apresenta várias ações farmacológicas importantes, entre elas a capacidade de se ligar com alta afinidade aos sítios de ligação imidazólicos e aos receptores α_2 -adrenérgicos e estimular a liberação de catecolaminas e alguns hormônios (LI et al, 1994; REIS e REGUNATHAN, 2000; RAASCH et al., 2001; BERKELS et al., 2004). Além disso, a agmatina exerce uma importante função na neurotransmissão no SNC, pois é capaz de bloquear as correntes iônicas geradas pela ativação do receptor glutamatérgico ionotrópico NMDA de forma dependente da concentração e da voltagem sem, no entanto, alterar o fluxo iônico provocado pela ativação dos receptores AMPA e cainato. Este bloqueio nos receptores NMDA acontece de maneira não-competitiva e ocorre em um sítio dentro do poro do canal do receptor. De fato, muitos neurônios glutamatérgicos pré-sinápticos, principalmente neurônios hipocâmpais, contêm agmatina, sugerindo assim que a agmatina e o glutamato são co-localizados no mesmo terminal. Alguns trabalhos também demonstram que a agmatina é capaz de modular a atividade de canais iônicos operados por ligantes, como o receptor nicotínico e o 5-HT₃, ativados pela acetilcolina e serotonina, respectivamente. Além disso, é importante ressaltar que a agmatina é capaz de inibir todas as isoformas da sintase do óxido nítrico (NOS) (GALEA et al., 1996; REIS et al., 1998; REGUNATHAN et al., 1999; YANG e REIS, 1999; REIS e REGUNATHAN, 2000; RAASCH et al., 2001; WEISINGER, 2001; BERKELS et al., 2004).

Devido a sua influência em diferentes sistemas de neurotransmissores e hormônios, estudos têm demonstrado que a agmatina exerce diversas funções fisiológicas importantes tanto centralmente quanto periféricamente. Em nível periférico exerce uma importante função cardiovascular no controle da pressão arterial em nível cardíaco e vascular (para revisão ver RAASCH et al., 2001). Além disso, a agmatina modula o metabolismo da glicose

e insulina, além de promover a liberação de adrenalina e noradrenalina das células cromafins da adrenal e liberação de insulina das ilhotas de Langerhans pancreáticas (ALBERTI et al., 1973; SCHWARTZ et al., 1997; REIS e REGUNATHAN, 2000). No rim, a agmatina é natriurética, aumenta a excreção de íons Na^+ e a filtração glomerular (SCHWARTZ et al., 1997). A agmatina também é dotada de funções em nível gastrointestinal. Glavin e colaboradores (1995) demonstraram que a agmatina possui atividade pró-secretória e ulcerogênica, pois ela aumenta a secreção de ácido gástrico e pepsina, reduz a espessura do muco e ainda exacerba as lesões na mucosa induzidas por estresse. A *Helicobacter pylori*, bactéria gram-negativa causadora de úlcera gástrica e duodenal, apresenta atividade da enzima ADC, podendo levar a síntese e liberação de agmatina (TOMB et al., 1997; RAASCH et al., 2001). O crescimento desta bactéria é dependente das concentrações de agmatina, além disso, a quantidade de agmatina encontrada no suco gástrico de pacientes infectados com *H. pylori* é aproximadamente o dobro daquelas encontradas em pacientes não-infectados (RAASCH et al., 2001). A agmatina também está envolvida nos processos de crescimento celular (para revisão ver RAASCH et al., 2001). Além disso, recentemente vários trabalhos têm demonstrado que agmatina é capaz de inibir a proliferação de células tumorais (DUDKOWSKA et al., 2003; GARDINI et al., 2003; KRIBBEN et al., 2004; MOLDERINGS et al., 2004).

Em nível central também são atribuídas diversas funções neurobiológicas para a agmatina. No SNC, a agmatina promove a liberação do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH) do hipotálamo (KALRA et al., 1995, REIS E REGUNATHAN, 2000). Além disso, a agmatina apresenta importante atividade neuroprotetora em diversos modelos animais de isquemia focal, global e isquemia da medula espinhal, promovendo redução de infartos isquêmicos, perda de neurônios hipocâmpais e aceleração da recuperação do déficit

motor, respectivamente (GILAD et al., 1996; GILAD e GILAD, 2000; OLMOS et al., 1999). A agmatina também apresenta efeito antidepressivo em alguns modelos comportamentais de depressão (ARICIOGLU e ALTUMBAS, 2003; LI et al., 2003). Além disso, Zomkowski e colaboradores (2002, 2004) demonstraram que a agmatina apresenta significativo efeito antidepressivo em dois modelos preditivos de depressão (testes do nado forçado e da suspensão da cauda) em camundongos, sendo que pelo menos em parte, uma interação com os receptores NMDA, a via da L-arginina-óxido nítrico e os receptores α_2 -adrenérgicos, 5-HT₁ e 5-HT₂ estão envolvidos na sua ação antidepressiva. Outras possíveis funções neurofisiológicas também são atribuídas para a agmatina, incluindo propriedades cognitiva, ansiolítica e anticonvulsivante, além de participar do controle da dor (FAIRBANKS et al., 2000; REIS e REGUNATHAN, 2000; RAASCH et al., 2001; ARTENI et al. 2002; ARICIOGLU e ALTUMBAS, 2003; DEMEHRI et al., 2003; LAVINSKY et al., 2003; KEKESI et al., 2004).

1.2 DOR

O organismo possui diversos sistemas responsáveis pelo controle da homeostasia, dentre eles a dor tem papel de destaque, pois atua como um mecanismo de alerta do corpo, pois “informa” que algo está ameaçando nosso bem-estar e retém nossa atenção até que a sua causa tenha sido identificada e afastada (WALL, 1999). Neste sentido, a dor é um sintoma clinicamente importante para a detecção e avaliação de muitas doenças. A dor foi definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor como sendo “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em

termos de tal lesão” (LOESER e MELZACK, 1999). Entretanto, sua percepção é complexa e não envolve apenas a transdução de um estímulo nocivo, mas também processos emocionais e cognitivos em nosso cérebro (JULIUS e BASBAUM, 2001). Assim, pode-se dizer que a dor é influenciada por fatores tanto fisiológicos quanto psicológicos, e por isso, em animais é avaliada de forma indireta. Neste sentido, o componente fisiológico da dor é denominado de nocicepção, com isso, modelos animais de analgesia são de fato modelos de nocicepção (TJØLSEN e HOLE, 1997).

Em termos de duração, um episódio de dor pode ser agudo ou crônico. Na dor aguda, ocorre ativação dos nociceptores em resposta a alguma lesão tecidual. Se persistir mais que alguns dias ou semanas, então passa a ser considerada como dor crônica. Da mesma forma que a dor aguda, a dor crônica também é causada por lesão ou patologia, podendo permanecer mesmo depois da recuperação do indivíduo (LOESER & MELZACK, 1999). Quanto a sua origem, existem quatro tipos principais de dor. A “dor nociceptiva”, que se origina devido à estimulação excessiva dos nociceptores localizados na pele, vísceras e outros órgãos. A “dor neurogênica”, que reflete o dano de tecido neuronal na periferia ou no sistema nervoso central (“dor central”). Um outro tipo é a “dor neuropática”, que acontece devido a uma disfunção ou dano de um nervo ou grupo de nervos. Por último, a “dor psicogênica”, que não é oriunda de uma fonte somática identificável e que pode refletir fatores psicológicos (MILLAN, 1999). No entanto, quando ocorre um significativo dano tecidual, a dor é geralmente mais persistente e acompanhada de inflamação. Nestas circunstâncias, geralmente ocorre um quadro de hipersensibilidade causado pela ativação e sensibilização dos nociceptores periféricos por mediadores químicos produzidos pela lesão tecidual e pela inflamação (DRAY, 1997). Dentre as desordens que comumente ocorrem em pacientes que apresentam dor com quadros de hipersensibilidade, pode-se citar a hiperalgesia

(resposta aumentada para estímulos nocivos) e a alodínia (resposta aumentada para estímulos não nocivos) (MILLAN, 1999). Neste sentido, apesar dos neurônios espinhais possuírem uma relação estímulo-resposta estável para estímulos intermitentes, breves e não nocivos, eles estão sujeitos à plasticidade sináptica dependente de seu emprego e atividade. Com isso, entradas nociceptivas repetitivas de baixa frequência ou lesão tecidual periférica levam a mudanças funcionais na medula espinhal, tais como aumento da resposta a estímulos supralimiares, redução do limiar nociceptivo, expansão do tamanho do campo receptivo (hiperalgesia secundária) e descargas neuronais prolongadas, gerando assim um quadro de hipersensibilidade (MA e WOOLF, 1996).

A recepção do estímulo nociceptivo em nível periférico se dá por estruturas específicas situadas nas terminações nervosas das fibras sensoriais, denominadas nociceptores. Os nociceptores estão localizados na porção distal dos neurônios aferentes sensitivos que estão amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras. A pele é responsável por fornecer a maioria das informações nociceptivas da periferia ao SNC, pois a maior parte dos estímulos nociceptivos são captados neste tecido. Além disso, os nociceptores são receptores sensíveis a diferentes estímulos que podem ser térmicos, mecânicos ou químicos (Fig. 3). No entanto, a sinalização química é provavelmente a mais comum e a que apresenta as mais diversas formas de geração de sinal nos neurônios sensitivos (BESSON e CHAOUCH, 1987; DRAY, 1997; BESSON, 1999; MILLAN, 1999). Existem ainda os chamados nociceptores silenciosos (“silent” ou “sleeping”), que são uma pequena proporção das fibras aferentes, as quais normalmente não são responsivas a estímulos. Entretanto, quando influenciados por mediadores inflamatórios ou após a administração de agentes flogísticos, apresentam atividade espontânea ou tornam-se sensibilizados e respondem a estímulos sensoriais (JULIUS e BASBAUM, 2001).

Os corpos celulares dos neurônios aferentes primários, onde se encontram os terminais nociceptivos, estão localizados nos gânglios da raiz dorsal. Após emergir de seu corpo celular, o axônio aferente primário bifurca-se para enviar prolongamentos à medula espinhal e outro para inervar os tecidos corporais. Os aferentes primários são classificados de acordo com critérios funcionais e anatômicos, entre eles velocidade de condução, diâmetro e grau de mielinização (Fig. 3). Os neurônios mais mielinizados, de maior diâmetro e que apresentam a maior velocidade de condução são as fibras A β . Essas fibras respondem de forma máxima ao leve toque ou movimento, são encontradas basicamente nos nervos que inervam a pele e nos indivíduos normais, não contribuem para a dor. Entretanto, a estimulação dessas fibras pode aliviar a dor, é o que ocorre quando elas são ativadas por fricção da pele pela mão após alguma lesão. Por outro lado, existem outros dois tipos de aferentes primários responsáveis pela transmissão da sensação da periferia à medula espinhal. As fibras de pequeno e médio diâmetro originam a maioria dos nociceptores e incluem as fibras C não mielinizadas e as fibras pouco mielinizadas A δ , respectivamente. Estas fibras são as responsáveis por transmitir o estímulo nociceptivo. No entanto, a condução ocorre de forma mais lenta do que aquela observada para as fibras A β (Fig. 3). As fibras A δ transmitem a sensação da periferia ao SNC em uma velocidade entre 12 a 30 m/s, enquanto as fibras C, também conhecidas como fibras polimodais C conduzem o estímulo em uma velocidade entre a 0,5 a 2 m/s. Existem ainda duas classes principais de fibras A δ , sendo diferenciadas por suas diferenças de resposta à estimulação térmica ou por lesão tecidual. As fibras A δ do tipo I respondem a temperaturas inferiores a 53°C, enquanto as fibras A δ do tipo II respondem a temperaturas menores que 43°C (PLEUVRY, 1996; SHELLEY, 1994; MILLAN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001).

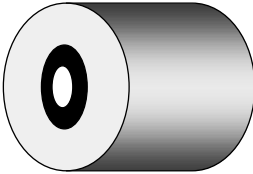
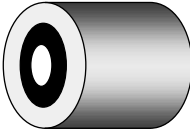

Tipos de fibras	Aα e Aβ 	Aδ (I e II) 	C 
Mielinização	Muita	Pouca	Ausente
Diâmetro	10 μm	2-6 μm	0,4-1,2 μm
Velocidade de condução	30-100 m/s	1,2-30 m/s	0,5-2 m/s
Tipo de sinal	Propriocepção Toque leve	Nocicepção (térmica, mecânica e química)	Nocicepção (térmica, mecânica e química)

Figura 3: Diferentes tipos de neurônio sensoriais primários responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC. Adaptado a partir de Julius e Basbaum, 2001.

Diante do acima mencionado, a ativação dos nociceptores pode ocorrer em decorrência de estímulos térmicos que podem ser frio ou calor, estímulos mecânicos com intensidade suficiente para ativar as fibras nociceptivas ou por uma série de irritantes químicos. No entanto, a atividade e o metabolismo dessas fibras também são amplamente regulados por mecanismos endógenos, como produtos da lesão tecidual e mediadores

inflamatórios (Fig. 4). Após a lesão tecidual, esses mediadores podem ser liberados pelos neurônios sensoriais e simpáticos e por células não neuronais como plaquetas, células sanguíneas, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos, células de Schwann e até mesmo pelas próprias células inflamatórias (BESSION, 1997). Assim, neurotransmissores e neuromoduladores como substância P (SP), trifosfato de adenosina (ATP), óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGs), neuropeptídeo Y (NPY), colecistocinina (CCK), neurotrofinas, bombesina, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), opióides, somatostatina, acetilcolina, prótons, adenosina, bradicinina, histamina, serotonina, glutamato e outros aminoácidos excitatórios podem ser liberados de diversas fontes após um estímulo capaz de gerar lesão tecidual (Fig. 4). Neste sentido, a maior parte da ativação destas fibras é produzida por receptores específicos acoplados a cascatas de segundos mensageiros intracelulares e canais iônicos. Estes processos de ativação afetam a excitabilidade da membrana e podem alterar a transcrição gênica, induzindo assim alterações, em longo prazo, na bioquímica dos neurônios sensoriais. Desta forma, estas alterações podem causar aumento ou diminuição da produção de mediadores químicos (por exemplo, bradicinina), expressão de canais iônicos (por exemplo, canais de Na⁺) e receptores (por exemplo, NK1, receptores de glutamato, entre outros), bem com na indução de enzimas (por exemplo, iNOS). Muitas substâncias causam ativação direta dos nociceptores (por exemplo, bradicinina, ATP, capsaicina) causando assim uma dor de característica aguda. Entretanto mediadores inflamatórios (por exemplo, prostaglandinas) produzem dor por sensibilizar os nociceptores. Isto acontece pela ativação direta de proteínas quinases intracelulares e alteração da excitabilidade da membrana ou indiretamente via síntese e liberação de outros reguladores celulares (por exemplo, citocinas). Além disso, uma excitabilidade anormal causada por inflamação ou lesão neuronal, normalmente pode decorrer do aparecimento de novos canais

iônicos e receptores. Sendo assim, substâncias capazes de causar modificações seletivas destes processos podem dar origem a novos agentes analgésicos e antiinflamatórios (DRAY et al., 1994; GUIRIMAND e LE BARS, 1996; BESSON, 1997; COGGESHALL e CARLTON, 1997; DRAY, 1997; BESSON, 1999; MILLAN, 1999; RAJA et al., 1999).

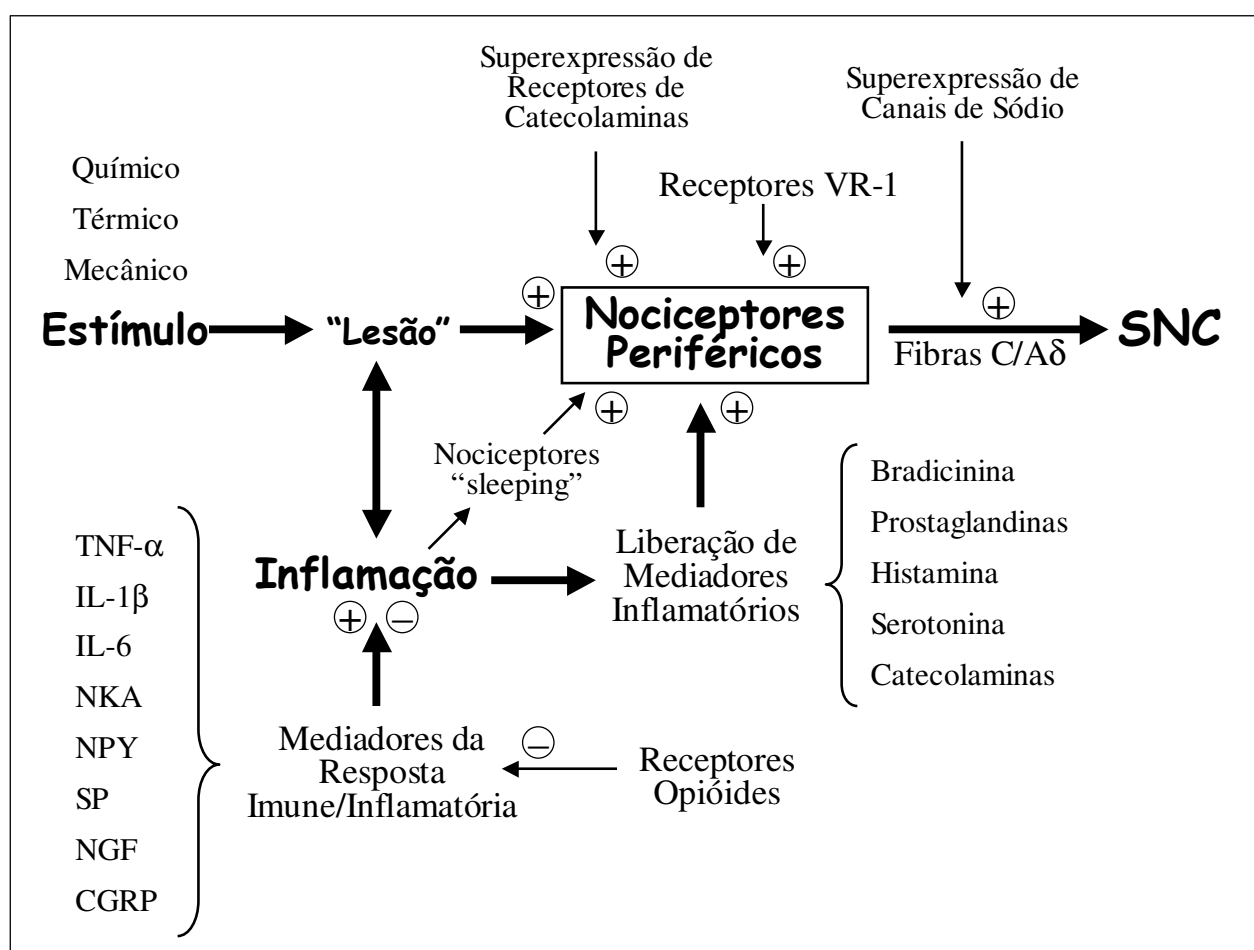


Figura 4: Fatores responsáveis pela ativação de nociceptores periféricos. + significa estimula e - significa inibe. Adaptado a partir de Hill, 2001.

Os mediadores químicos liberados após diferentes estímulos fazem com que a informação nociceptiva seja levada através das fibras aferentes ao SNC, para que este a processe e responda adequadamente em cada situação. Inicialmente, os impulsos nociceptivos chegam através dos aferentes primários na medula espinhal, mais precisamente no corno dorsal, área primária de recebimento da maioria das informações somatossensoriais (COGGESHALL e CARLTON, 1997). O corno dorsal da medula é uma estrutura dividida em lâminas com base em sua citoarquitetura. As fibras aferentes primárias C e A δ têm suas terminações principalmente nas lâminas mais superficiais [lâmina I (zona marginal) e lâminas II (substância gelatinosa)] (BESSON e CHAOUCH, 1987). Além disso, a informação nociceptiva se projeta do corno dorsal da medula para o tálamo através de neurônios de segunda ordem, ou neurônios sensoriais secundários, que compreendem as vias ascendentes. Os neurônios sensoriais secundários recebem seus sinais sensoriais pela liberação de glutamato e SP dos aferentes primários, além disso, este processo excitatório também depende de canais de cálcio e sódio, sendo os canais de cálcio os principais reguladores da liberação de neurotransmissores (HILL, 2001). As vias ascendentes mais importantes são: o trato espinotalâmico, o trato espinoreticular e o trato espinomesencefálico entre outros. Neste sentido, o organismo também possui mecanismos intrínsecos para o controle da dor, pois após a estimulação de diferentes núcleos do tálamo, os sinais são transmitidos para diversas áreas do córtex sensorial somático, substância cinzenta periaquedutal (PAG), hipotálamo, amígdala e cerebelo, onde a informação de presente contexto é integrada com experiências do passado e processada para produzir a percepção da dor e promover a resposta adequada que é enviada para a medula espinhal através dos neurônios descendentes (GUYTON, 1992; BESSON, 1999; CRAIG e DOSTROVSKY, 1999; MILLAN 1999). Além disso, a modulação descendente da informação nociceptiva

envolve uma série de estruturas cerebrais, como mencionado anteriormente, e sistemas de neurotransmissores dentre os quais podemos mencionar os sistemas opióide, serotoninérgico, noradrenérgico, gabaérgico, glutamatérgico, além de canabinóides endógenos entre outras substâncias (para revisão ver MILLAN, 2002).

Nos últimos anos, há um número crescente de evidências indicando que a agmatina é capaz de inibir a transmissão nociceptiva em nível central e prevenir também os estados de alodínia, hiperalgesia e autotomia que acompanham a hipernocicepção provocada por inflamação, lesão da medula espinhal e lesão de nervo periférico em modelos animais de dor inflamatória e neuropática, respectivamente (HORVÁTH et al., 1999; FAIRBANKS et al., 2000; ARICIOGLU-KARTAL et al., 2003; HOU et al., 2003; KARADAG et al., 2003; ÖNAL et al., 2003; YU et al., 2003; KEKESI et al., 2004). Assim, a agmatina é capaz de promover antinocicepção (analgesia) ou antihipernocicepção contra estímulos nocivos (antihiperalgesia) e não-nocivos (antialodinia) que aparecem após lesão de tecido (NGUYEN et al., 2003). A agmatina também promove um aumento, de maneira dependente da dose, da analgesia causada pela morfina, particularmente quando administrada pela via intratecal (i.t.) (YESILYURT e UZBAY, 2001). Esta ação parece estar relacionada com as evidências de que, cronicamente, a agmatina inibe a tolerância e os sintomas de retirada aos opióides (por exemplo, morfina) em ratos e camundongos (KOLESNIKOV et al., 1996; ARICIOGLU-KARTAL e REGUNATHAN, 2002; ARICIOGLU et al., 2004). Além disso, Morgan e colaboradores (2002) demonstraram que a agmatina também modula eventos neuroadaptativos relacionados à auto-administração crônica de opióide em ratos.

Entretanto, apesar do crescente número de trabalhos demonstrando o efeito antinociceptivo e antihipernociceptivo da agmatina em diferentes espécies, seu preciso mecanismo de ação ainda permanece não compreendido por completo. Neste sentido, o

presente trabalho se propõe a verificar a atividade antinociceptiva da agmatina, quando administrada sistemicamente, em alguns modelos de nocicepção química em camundongos, além de investigar alguns dos prováveis mecanismos envolvidos na sua ação antinociceptiva.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

Estender e analisar a ação da agmatina no controle da nocicepção através de estudos farmacológicos “in vivo”, utilizando diferentes protocolos experimentais em camundongos.

2.2 OBJETIVOS GERAIS

Verificar a atividade antinociceptiva da agmatina, administrada sistemicamente, nos modelos do ácido acético, capsaicina, formalina e glutamato em camundongos.

Verificar a participação da via da L-arginina-óxido nítrico, dos canais de cálcio e dos sistemas imidazólico, α_2 -adrenérgico, serotoninérgico e opióide na ação antinociceptiva da agmatina no modelo do ácido acético em camundongos.

Verificar a participação da proteína $G_{i/o}$ sensível à toxina pertussis e das fibras C sensíveis à capsaicina na ação antinociceptiva da agmatina no modelo do ácido acético em camundongos.

3. MATERIAIS

3.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos suíços de ambos os sexos (25 a 35 g) obtidos do Biotério Central da UFSC, mantidos em temperatura controlada de 22 ± 2 °C, em ciclo de 12h claro e 12h escuro (luzes acesas às 6:00h) e com água e ração *ad libitum*. Os animais foram distribuídos homogeneamente entre os grupos e mantidos no laboratório para aclimação por pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos, sendo que os experimentos descritos foram realizados de acordo com as normas éticas para o estudo de dor com animais de laboratório (ZIMMERMANN, 1983). O número de animais utilizados e os estímulos empregados foram os mínimos necessários para demonstrar efeito dos tratamentos. Além disso, todos os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (protocolo 23080.005145/2003-19).

3.2 DROGAS E REAGENTES

As seguintes substâncias foram utilizadas neste trabalho: ácido acético, cloreto de cálcio (CaCl_2), formalina e hidrocloreto de morfina (Merck, Darmstadt, Germany); sulfato de agmatina, N^ω -nitro-L-arginina, hidrocloreto de L-arginina, hidrocloreto de D-arginina, capsaicina, hidrocloreto de clonidina, hidrocloreto de ácido L-glutâmico,

hidrocloridrato de naloxona, DL-p-clorofenilalanina-metil-éster (PCPA), pindolol, hidrocloridrato de ioimbina, toxina pertussis, ácido etilenoglicol-bis(β -aminoetil-éter)-N-N-N'-N'-tetraacético (EGTA), hidrocloridrato de buspirona (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA); hidrocloridrato de efaroxan, hidrocloridrato de idazoxan, tartarato de cetanserina, ácido caínico (cainato), ácido (\pm)-1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico (trans-ACPD), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA), ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), (5*S*,10*R*)-(+)-5-Metil-10,11-dihidro-5*H*-dibenzo[a,d] (MK-801) (Tocris Cookson Inc., Ellisville, USA); hidrocloridrato de ondansetron (Cristália, São Paulo, Brasil); cloreto de sódio (LabSynth, Diadema, Brasil). Todas as drogas foram dissolvidas imediatamente antes do uso em solução salina (0,9%), com exceção da capsaicina que foi dissolvida em 10% etanol, 10% tween 80 e 80% salina, no entanto, a concentração final de etanol não excedeu 5%, não causando assim efeito *per se*.

4. MÉTODOS

4.1 TESTES COMPORTAMENTAIS

4.1.1 Nocicepção induzida pelo ácido acético

Preliminarmente foi verificado o efeito da agmatina no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Este teste é descrito como um modelo típico de nocicepção inflamatória visceral e permite avaliar a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico (KOSTER et al., 1959; VINEGAR et al., 1979; TJØLSEN e HOLE, 1997). A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%) diluído em solução salina (NaCl 0,9%). As contorções abdominais consistem na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão de uma das patas posteriores, de acordo com o método descrito anteriormente (KOSTER et al., 1959; SANTOS et al., 1999). Grupos de animais foram pré-tratados com agmatina pela via intraperitoneal (i.p.) (1–30 mg/kg) ou pela via oral (v.o.) (10–300 mg/kg), 30 ou 60 min antes da realização dos experimentos, respectivamente; os grupos controles foram tratados com solução salina (10 ml/kg). Após a injeção do ácido acético os camundongos foram colocados individualmente em funis de vidro e o número de contorções abdominais foi cumulativamente quantificado durante um período de 20 min. A atividade antinociceptiva foi determinada pela inibição do número das contorções abdominais observadas nos animais pré-tratados sistemicamente (i.p. ou v.o.) com agmatina.

Em outra série de experimentos foi avaliada a duração do efeito antinociceptivo da agmatina. Para este fim, os animais receberam agmatina (10 mg/kg, i.p.) e transcorrido o tempo

de 0,5, 1, 2, 4 e 6 h após a administração, os animais foram injetados com ácido acético (0,6%) e o número de contorções abdominais foi avaliada conforme descrito anteriormente.

4.1.2 Nocicepção induzida pela capsaicina

Este modelo foi proposto por Sakurada e colaboradores (1992) e se presta ao estudo de compostos que atuam sobre a dor de origem neurogênica. A injeção intraplantar (i.pl.) de capsaicina induz a ativação dos receptores vanilóides, promovendo assim a estimulação direta dos neurônios nociceptivos e liberação de várias substâncias envolvidas na transmissão dolorosa (SANTOS e CALIXTO, 1997; SAKURADA et al., 1996; 2003). Assim, esse teste foi empregado com o objetivo de evidenciar a possível interação da agmatina com a nocicepção de origem neurogênica.

Os camundongos foram colocados individualmente dentro de funis de vidro transparentes para adaptação durante um período de no mínimo 20 min, sendo que estes foram posteriormente utilizados para observar a resposta nociceptiva causada pela injeção de 20 µl de solução de capsaicina (1,6 µg/pata) na região intraplantar da pata posterior direita de cada animal. Em seguida, foi cronometrado durante 5 min o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com a solução de capsaicina. Este tempo foi considerado como indicativo de nocicepção. Os animais foram tratados com agmatina (3–100 mg/kg, i.p.) 30 min antes da realização dos experimentos. Os grupos controles foram tratados com solução salina (10 ml/kg).

4.1.3 Nocicepção induzida pela formalina

Para confirmação e melhor compreensão do efeito antinociceptivo da agmatina foi utilizado o teste de nocicepção induzida pela injeção i.pl. de formalina. Esse é um modelo

que permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica (estimulação direta dos neurônios nociceptivos) e a de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios) (HUNSKAAR e HOLE, 1987, TJØLSEN et al., 1992). O procedimento utilizado foi semelhante ao previamente descrito (SANTOS e CALIXTO, 1997; SANTOS et al., 1999). Os animais receberam 20 µl de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) na região intraplantar da pata posterior direita. Após a injeção de formalina os animais foram colocados em funis de vidro individuais em frente a espelhos e observados durante 0-5 min (primeira fase) e 15-30 min (segunda fase) após a injeção de formalina. O tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina foi cronometrado, sendo esse tempo considerado como indicativo de nocicepção. Os animais foram tratados com a agmatina pela via i.p. (1–100 mg/kg) 30 min antes da realização dos experimentos. Os grupos controles foram tratados com solução salina (10ml/kg).

Em outra série de experimentos, foi investigado o possível efeito antinociceptivo terapêutico da agmatina (tratamento dos animais com agmatina após o estímulo nocivo). Para este propósito, os animais foram tratados com agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) 5 min depois de terem recebido formalina pela via intraplantar. A resposta nociceptiva foi então avaliada em relação à segunda fase (inflamatória) da nocicepção induzida pela formalina.

4.1.4 Nocicepção induzida pelo glutamato

Este modelo se presta ao estudo de drogas que atuam sobre o sistema glutamatérgico (BEIRITH et al., 2002). Este sistema de neurotransmissor é um dos mais importantes sistemas envolvidos na modulação da nocicepção e da antinocicepção tanto em nível periférico quanto central (FUNDYTUS, 2001; RIEDEL e NEECK, 2001). Além disso, a injeção i.pl. de glutamato induz a estimulação direta dos neurônios nociceptivos, causando

assim a liberação de vários mediadores inflamatórios e neuropeptídeos também envolvidos na transmissão nociceptiva (BEIRITH et al., 2003).

Sendo assim, esse teste foi empregado com o objetivo de evidenciar a possível interação do sistema glutamatérgico na ação antinociceptiva da agmatina. Para isso os animais foram colocados individualmente em funis de vidro e logo após receberam 20 µl de solução de glutamato (10 µmol/pata) na região intraplantar da pata posterior direita. Durante os 15 min subseqüentes, foi cronometrado o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com glutamato, tempo este que foi considerado como indicativo de nocicepção (BEIRITH et al., 2002). Os animais foram tratados com a agmatina pela via i.p. (10–100 mg/kg, 30 min antes), os grupos controles foram tratados com solução salina (10 ml/kg).

4.1.5 Avaliação da atividade locomotora: Teste do Campo Aberto (open-field)

O teste do campo aberto foi usado para excluir a possibilidade de que a ação antinociceptiva da agmatina poderia estar relacionada com efeitos inespecíficos, tanto em nível central quanto periférico, sobre a atividade locomotora dos animais. O comportamento dos animais foi verificado conforme descrito previamente (RODRIGUES et al., 2002). O aparato consiste em uma caixa de madeira medindo 40 x 60 x 50 cm. O assoalho da arena é dividido em 12 quadrados iguais, e o número de cruzamentos com todas as patas (crossing), foi contado cumulativamente durante 6 min. Os animais foram tratados com agmatina (10 ou 100 mg/kg, i.p.), clonidina (0,1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) 30 min antes da realização do experimento.

4.2 ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO

De acordo com os resultados obtidos nos modelos de nocicepção anteriormente descritos, a etapa subsequente deste trabalho foi analisar alguns dos mecanismos que poderiam estar envolvidos no efeito antinociceptivo da agmatina. Para este fim, foi utilizado o modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético, sendo que a dose de agmatina utilizada para verificar a possível reversão causada por antagonistas foi de 10 mg/kg, administrada pela via i.p., 30 min antes da realização dos experimentos. As doses das drogas utilizadas foram selecionadas com base em dados da literatura ou então baseadas em resultados prévios do laboratório.

Os experimentos foram realizados seguindo o esquema ilustrado na figura 5

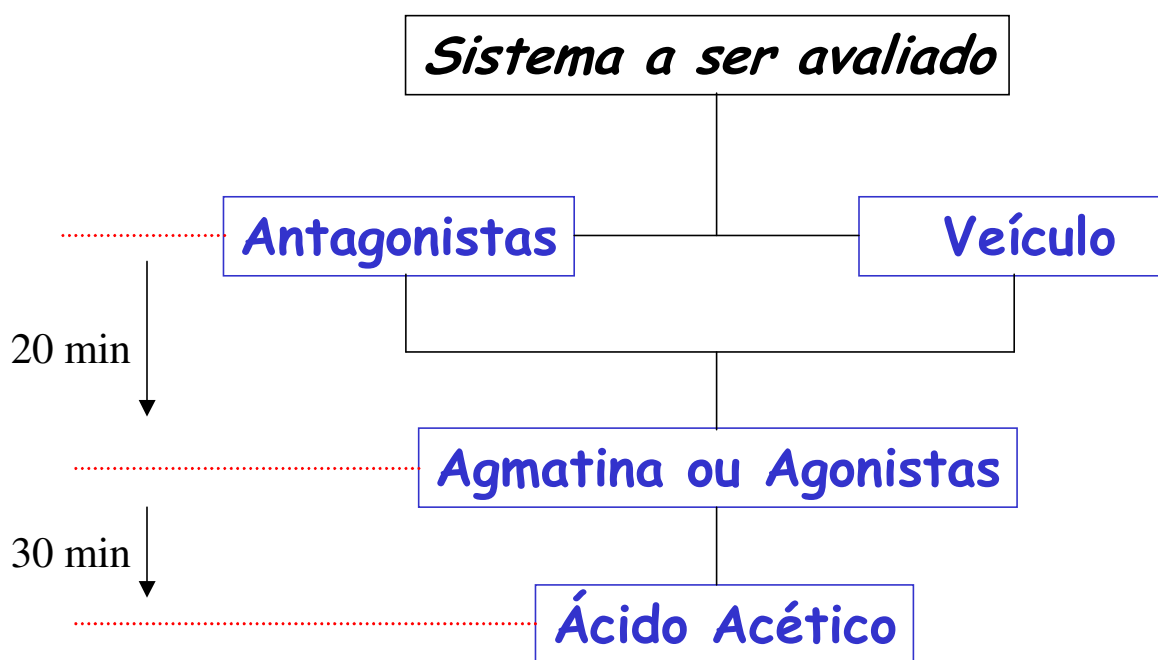


Figura 5: Esquema de tratamento dos animais na realização dos experimentos de mecanismo de ação utilizando o modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético

Desta forma, foram realizados os seguintes experimentos:

4.2.1 Envolvimento da via da L-arginina-óxido nítrico

Com o objetivo de evidenciar a participação da via da L-arginina-óxido nítrico na ação antinociceptiva da agmatina, os animais foram pré-tratados com L-arginina (precursor de óxido nítrico, 600 mg/kg, i.p.), D-arginina (isômero inativo da L-arginina, 600 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) 20 min antes da administração de agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou de L-NOARG (inibidor da sintase do óxido nítrico, 75 mg/kg, i.p.) conforme descrito anteriormente por Santos e colaboradores (1999). Após 30 min do tratamento dos animais com agmatina ou com L-NOARG, a resposta nociceptiva foi analisada em relação a nocicepção causada pelo ácido acético. Grupos de animais controles foram tratados com veículo, L-arginina ou D-arginina 30 min antes da injeção de ácido acético.

4.2.2 Envolvimento do sistema imidazólico

Com o objetivo de evidenciar a participação dos receptores imidazólicos na ação antinociceptiva da agmatina, os animais foram pré-tratados com efaroxan (antagonista misto dos receptores I₁ imidazólico/ α_2 -adrenérgico, 1 mg/kg, i.p.), idazoxan (antagonista misto I₂ imidazólico/ α_2 -adrenérgico, 3 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) 20 min antes da administração de agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou de clonidina (agonista misto α_2 -adrenérgico/imidazólico 0,1 mg/kg, i.p.) conforme descrito anteriormente (FAIRBANKS e WILCOX, 1999; SHANNON e LUTZ, 2000; LU et al., 2003). Após 30 min do tratamento dos animais com agmatina ou com clonidina, a resposta nociceptiva foi analisada em relação à nocicepção causada pelo ácido acético. Grupos de animais controles foram tratados com veículo, efaroxan ou idazoxan 30 min antes da injeção de ácido acético.

4.2.3 Envolvimento do sistema alfa (α)₂-adrenérgico

Com o objetivo de evidenciar a participação do sistema alfa (α)₂-adrenérgico na ação antinociceptiva da agmatina, os animais foram pré-tratados com ioimbina (antagonista dos adrenoreceptores do tipo α_2 , 0,15 mg/kg, i.p.) ou com o veículo (10 ml/kg, i.p.) 20 min antes da administração de agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou de clonidina (agonista α_2 -adrenérgico, 0,1 mg/kg, i.p.) conforme anteriormente descrito (MENDES et al., 2000). Após 30 min do tratamento dos animais com agmatina ou com clonidina, a resposta nociceptiva foi analisada em relação à nocicepção causada pelo ácido acético. Grupos de animais controles foram tratados com veículo ou ioimbina 30 min antes da injeção de ácido acético.

4.2.4 Envolvimento do sistema serotoninérgico

A fim de evidenciar a participação do sistema serotoninérgico sobre a atividade antinociceptiva da agmatina, os animais foram pré-tratados com p-clorofenilalanina (PCPA) (inibidor da síntese de serotonina, 100 mg/kg, i.p.) ou com veículo (10 ml/kg, i.p.), uma vez ao dia durante 4 dias consecutivos como descrito anteriormente (SANTOS et al., 1999). Após 20 min da última administração de PCPA, os animais receberam agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.). Após 30 min do tratamento dos animais com agmatina ou com veículo, a resposta nociceptiva foi analisada em relação à nocicepção causada pelo ácido acético.

Em outra serie de experimentos foi investigado a participação dos subtipos de receptores (5-HT_{1A/B}, 5-HT_{2A} e 5-HT₃) na ação antinociceptiva da agmatina. Para isto, os animais foram pré-tratados com os antagonistas dos receptores 5-HT_{1A/1B} (pindolol, 1 mg/kg, i.p.), 5-HT_{2A} (cetanserina, 0,3 mg/kg, i.p.) ou 5-HT₃ (ondansetron, 0,5 mg/kg, i.p.) 20 min antes da administração da agmatina como anteriormente descrito (TAKESHITA e

YAMAGUCHI, 1995; BHARGAWA e SAHA, 2001; DUMAN et al., 2004). Após 30 min do tratamento dos animais com agmatina, a resposta nociceptiva foi analisada em relação à nocicepção causada pelo ácido acético. Grupos de animais controles foram tratados com veículo, pindolol, cetanserina ou ondansetron 30 min antes da injeção de ácido acético.

4.2.5 Envolvimento do sistema opióide

Com o objetivo de evidenciar a participação do sistema opióide sobre a atividade antinociceptiva da agmatina, os animais foram pré-tratados com naloxona (antagonista dos receptores opióides, 1 mg/kg, i.p.) 20 min antes da administração da agmatina (10 mg/kg, i.p.) ou da morfina (controle positivo, 5 mg/kg, s.c.) conforme descrito anteriormente (SANTOS et al., 1999). Após o período de tratamento dos animais com a agmatina ou com morfina, a resposta nociceptiva foi analisada em relação a nocicepção causada pelo ácido acético. Grupos de animais controles foram tratados com veículo ou naloxona 30 min antes da injeção de ácido acético.

4.2.6 Envolvimento da proteína $G_{i/o}$ sensível à toxina pertussis

Com o objetivo de evidenciar a participação da proteína $G_{i/o}$ sensível à toxina pertussis, substância capaz de causar uma ribossilação da subunidade catalítica da proteína $G_{i/o}$, na ação antinociceptiva da agmatina, grupos de animais foram pré-tratados com toxina pertussis (0,5 µg/i.t.) ou com salina (5 µl/i.t.). Transcorridos 7 dias do pré-tratamento, os animais receberam agmatina (10 mg/kg, i.p.), morfina (5 mg/kg, i.p.) ou salina (10 ml/kg, i.p.) de acordo com o método anteriormente descrito (SANTOS et al., 1999). Após 30 min de tratamento dos animais com as diferentes substâncias, a resposta nociceptiva foi analisada em relação à nocicepção causada pelo ácido acético .

4.2.7 Envolvimento dos canais de cálcio

Com o objetivo de verificar a participação dos canais de cálcio na ação antinociceptiva da agmatina, os animais foram pré-tratados com cloreto de cálcio (CaCl_2) (doador de íons Ca^{2+} , 200 nmol/i.c.v.) ou EGTA (quelante de íons divalentes, 30 nmol/i.c.v.) 20 min antes da administração da agmatina (LIANG et al., 2004). Após 30 min do tratamento dos animais com agmatina, a resposta nociceptiva foi analisada em relação a nocicepção causada pelo ácido acético. Grupos de animais controles foram tratados com veículo, CaCl_2 ou EGTA 30 min antes da injeção de ácido acético. A administração por via i.c.v. foi realizada em camundongos levemente anestesiados com éter, através da inserção da agulha injetora conectada por uma cânula de polipropileno em uma microseringa Hamilton de 25 μl diretamente no ventrículo lateral esquerdo, com a fissura bregma como referência (1 mm lateral e 1 mm posterior ao bregma e 2,4 mm de profundidade).

4.2.8 Envolvimento das fibras C sensíveis à capsaicina

Com a finalidade de verificar a participação dos neurônios sensoriais sensíveis a capsaicina (fibras C e $\text{A}\delta$) na ação antinociceptiva da agmatina, grupos de animais foram pré-tratados no segundo dia de vida com capsaicina (50 mg/kg, s.c.) com o objetivo de induzir uma degeneração irreversível dos neurônios aferentes primários de pequeno diâmetro, especialmente das fibras C (HOLZER, 1991; BEIRITH et al., 2003). Outro grupo de animais recebeu também no 2º dia de vida, pela mesma via, o mesmo volume do veículo usado para dissolver a capsaicina (10% etanol, 10% tween 80 e 80% salina). A ação antinociceptiva da agmatina foi analisada após 2 meses em relação à nocicepção causada pelo ácido acético.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), exceto os valores de DI₅₀ (doses de agmatina que reduziram as respostas nociceptivas em 50% em relação ao grupo controle), que estão apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança em nível de 95%. As análises estatísticas entre os grupos experimentais foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Newman Keuls. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Os valores de DI₅₀ foram obtidos através do método de regressão linear utilizando-se o software Graph Pad InStat® (1994, San Diego, CA) versão 2.05.

5. RESULTADOS

5.1 TESTES COMPORTAMENTAIS

5.1.1 Nocicepção induzida pelo ácido acético

Os resultados apresentados na figura 6 mostram que a agmatina, administrada tanto por via i.p. quanto por v.o., produziu uma inibição significativa e dependente da dose do número das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, com valores de DI_{50} (e seus respectivos limites de confiança de 95%) de 5,6 (3,9-8,0) e 147,3 (108,9-199,1) mg/kg e inibições de 83 ± 4 e $57 \pm 6\%$, respectivamente (Tabela 2). Desta forma, a agmatina foi aproximadamente 26 vezes mais potente quando administrada pela via intraperitoneal, em inibir a nocicepção induzida pelo ácido acético, do que quando administrada pela via oral. Além disso, os resultados apresentados na figura 7 mostram que a resposta antinociceptiva da agmatina foi máxima 30 min após sua administração pela via i.p., sendo gradativamente reduzida, contudo, se manteve significativa por até 4 h após sua administração.

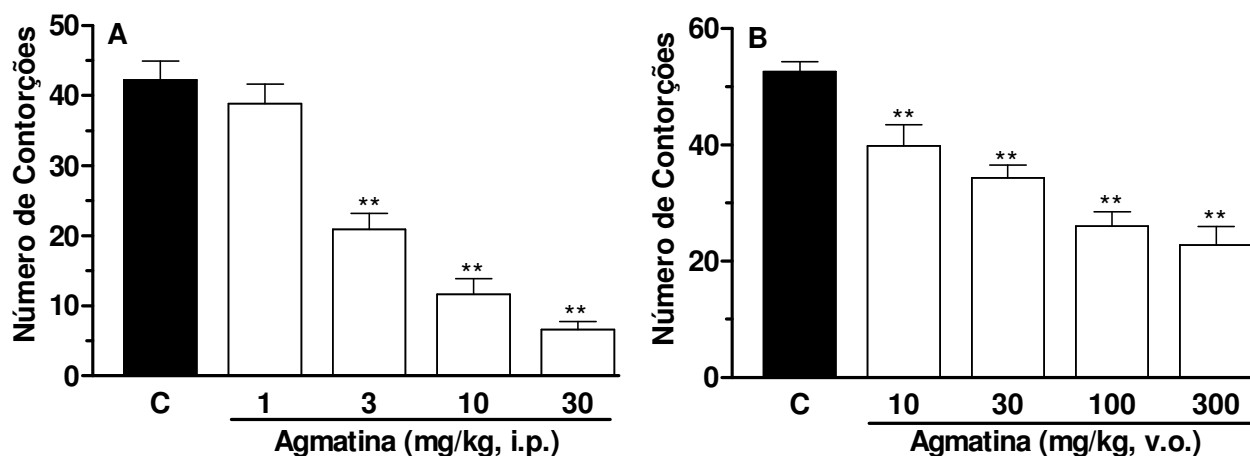


Figura 6: Efeito antinociceptivo da agmatina (1-300 mg/kg) administrada pela via i.p. (A) ou v.o. (B) em relação a nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. ** P < 0,01 difere significativamente do grupo controle (barra cheia).

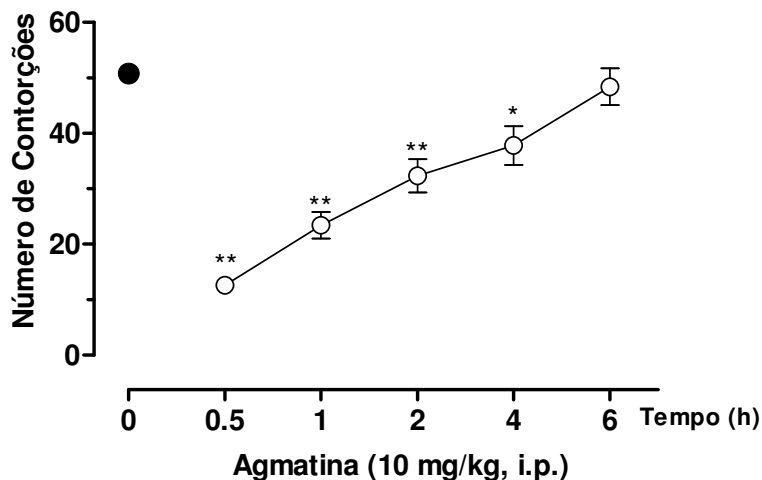


Figura 7: Efeito antinociceptivo tempo-dependente da agmatina (10 mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%) em camundongos. Cada grupo representa a média de 5-6 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ difere significativamente do grupo controle (círculo cheio).

5.1.2 Nocicepção induzida pela capsaicina

O tratamento dos animais com agmatina pela via i.p. também produziu uma inibição significativa e dependente da dose da nocicepção neurogênica induzida pela capsaicina (Fig. 8), com valores de DI_{50} de 43,7 (23,5-81,4) mg/kg e inibição de $55 \pm 4\%$ (Tabela 2).

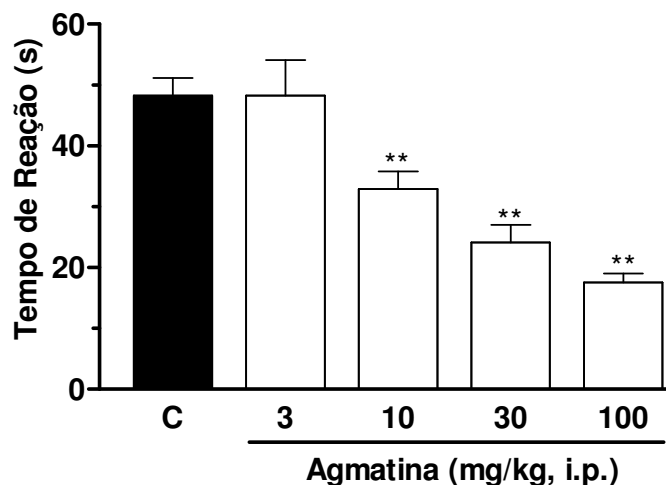


Figura 8: Efeito antinociceptivo da agmatina (3-100 mg/kg) administrada pela via i.p. em relação à nocicepção induzida pela capsaicina (1,6 µg/i.pl.) em camundongos. Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. ** $P < 0,01$ difere significativamente do grupo controle (barra cheia).

5.1.3 Nocicepção induzida pela formalina

A figura 9 demonstra que a agmatina (1-100 mg/kg, i.p.) inibiu de maneira significativa e dependente da dose tanto a nocicepção de origem neurogênica quanto a de origem inflamatória induzida pela formalina. Os valores de DI_{50} para a primeira (nocicepção neurogênica) e segunda (nocicepção inflamatória) fase foram de 13,7 (8,6-21,9) e 5,6 (4,5-7,1) mg/kg e inibições máximas (IM) de 65 ± 5 e $76\pm 4\%$, respectivamente (Tabela 2).

Os dados apresentados na figura 10 mostram claramente que a agmatina (10 mg/kg, i.p.) também é dotada de atividade terapêutica, tendo em vista que, quando administrada 5 min após a injeção de formalina, foi capaz de inibir de maneira significativa a segunda fase (nocicepção inflamatória). Além disso, pode-se observar que a ação terapêutica (após a formalina) da agmatina não diferiu de forma significativa da ação profilática (antes da formalina), apresentando inibições de 42 ± 6 e $56\pm 5\%$ em relação a segunda fase do teste da formalina, respectivamente.

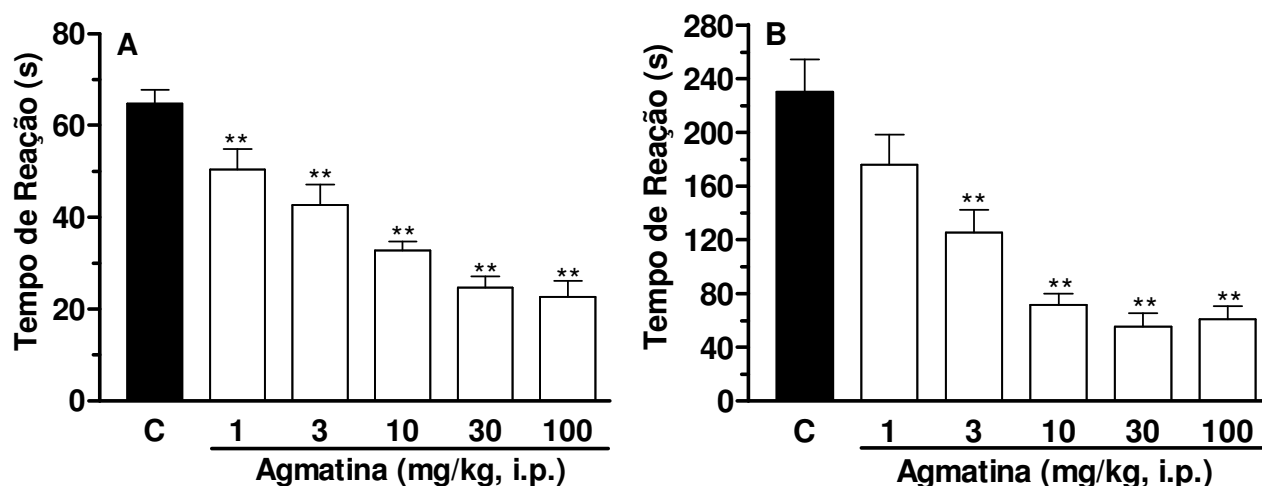


Figura 9: Efeito antinociceptivo da agmatina (1-100 mg/kg) administrada pela via i.p. em relação à primeira (A) e segunda (B) fase da nocicepção induzida pela formalina (2,5%) em camundongos. Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. ** $P < 0,01$ difere significativamente dos grupos controles (barras cheias).

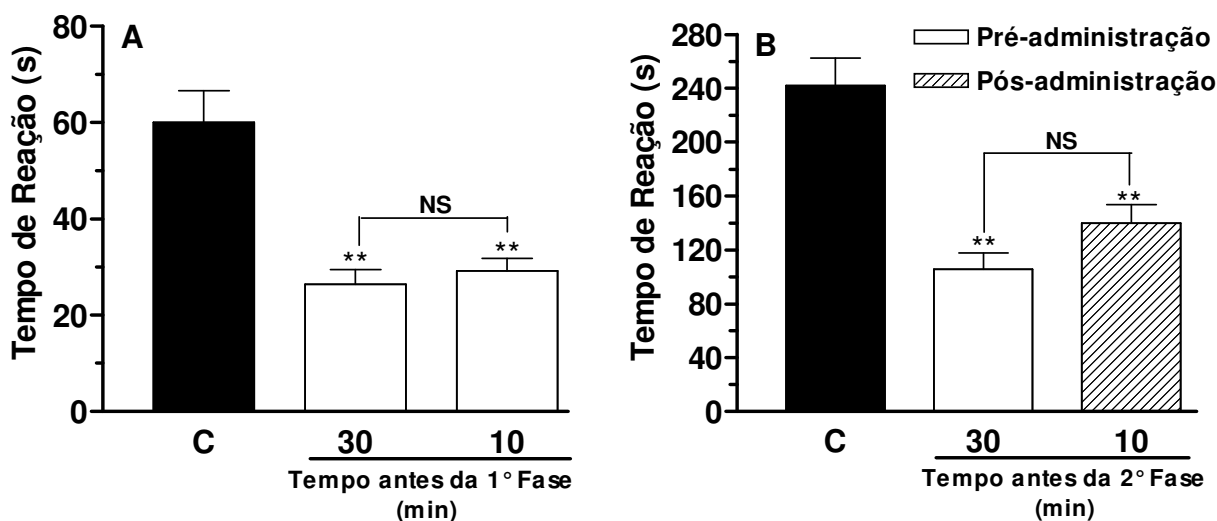


Figura 10: Efeito antinociceptivo tempo-dependente da agmatina (10 mg/kg, i.p.) em relação à primeira (A) e segunda (B) fase da nocicepção induzida pela formalina (2,5%). Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. ** $P < 0,01$ difere significativamente dos grupos controles (barras cheias) e NS não diferem significativamente entre grupos.

5.1.4 Nocicepção induzida pelo glutamato

Os resultados apresentados na figura 11 mostram que a agmatina, quando administrada pela via i.p., também causou uma inibição significativa e dependente da dose da nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato, com DI_{50} de 19,5 (15,3-24,8) mg/kg e IM de $76 \pm 4\%$ (Tabela 2).

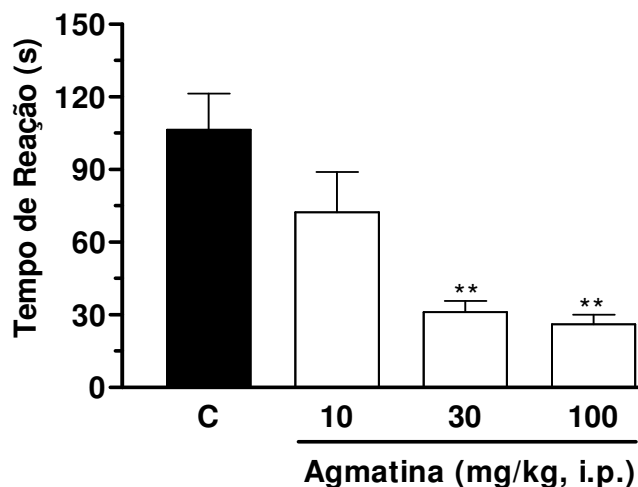


Figura 11: Efeito antinociceptivo da agmatina (10-100 mg/kg) administrada pela via i.p. em relação à nocicepção induzida pela injeção i.pl. de glutamato (10 μ mol/i.pl.) em camundongos. Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. ** $P < 0,01$ difere significativamente do grupo controle (barra cheia).

5.1.5 Avaliação da atividade locomotora: Teste do Campo Aberto (open-field)

O tratamento dos animais com agmatina (10 ou 100 mg/kg, i.p.), doses nas quais apresentaram significativo efeito antinociceptivo nos modelos de nocicepção química anteriormente mostrados, não foi capaz de causar mudança significativa sobre a atividade locomotora dos animais quando avaliados no teste do campo-aberto (Tabela 1). No entanto, a clonidina (0,1 mg/kg, i.p.) reduziu de forma significativa a atividade locomotora dos animais neste teste. A média do número de cruzamentos entre os grupos foi de 70 ± 8 ; 68 ± 6 ; 77 ± 7 e 31 ± 4 , respectivamente para os grupos controle, agmatina (10 e 100 mg/kg) e clonidina.

Tabela 1: Efeito do tratamento dos animais com agmatina (10 ou 100 mg/kg, i.p.), clonidina (0,1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10 ml/kg, i.p.) sobre a atividade locomotora de camundongos avaliados no teste do campo aberto.

Substâncias	Dose	Via de administração	Número de cruzamentos	% de inibição
Veículo	10 ml/kg	i.p.	70 ± 8	
Agmatina	10 mg/kg	i.p.	68 ± 6	0 ^{NS}
	100 mg/kg	i.p.	77 ± 7	0 ^{NS}
Clonidina	0,1 mg/kg	i.p.	$31 \pm 4^{***}$	$55 \pm 5^{***}$

Cada grupo representa a média de 8-10 animais. *** $P < 0,001$ difere significativamente do grupo tratado com o veículo; ^{NS} não diferem significativamente do grupo tratado com o veículo.

Tabela 2: Valores de DI_{50} e IM calculados para a agmatina nos diferentes modelos de nocicepção utilizados.

Modelo	Via de administração da Agmatina	DI_{50} e intervalos de confiança (mg/kg)	IM (%)
Ácido acético	i.p.	5,6 (3,9-8,0)	83 ± 4
Ácido acético	v.o.	147,3 (108,9-199,1)	57 ± 6
Capsaicina	i.p.	43,7 (23,5-81,4)	55 ± 4
Formalina 1º fase	i.p.	13,7 (8,6-21,9)	65 ± 5
Formalina 2º fase	i.p.	5,6 (4,5-7,1)	76 ± 4
Glutamato	i.p.	19,5 (15,3-24,8)	76 ± 4

5.2 ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO

5.2.1 Envolvimento da via da L-arginina-óxido nítrico

Os resultados apresentados na figura 12 mostram que o pré-tratamento dos animais com o precursor do óxido nítrico, a L-arginina (600 mg/kg, i.p.), mas não com seu isômero inativo, a D-arginina (600 mg/kg, i.p.), reverteu completamente a antinocicepção causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) e pelo L-NOARG (75 mg/kg, i.p.).

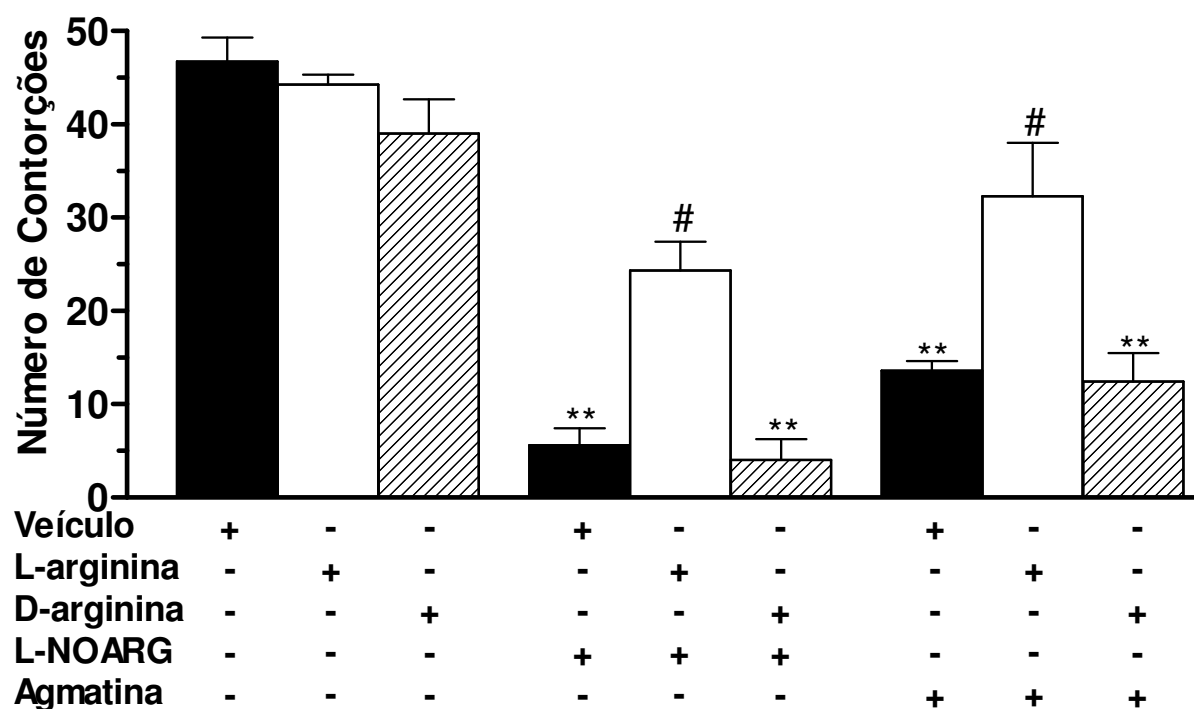


Figura 12: Influência do pré-tratamento dos camundongos com L-arginina (600 mg/kg, i.p.) e D-arginina (600 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo da agmatina (10 mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. ** P < 0,01 difere significativamente dos grupos controles (veículo, L-arginina e D-arginina) e #P < 0,01 difere significativamente dos grupos dos animais tratados com os agonistas (L-NOARG e agmatina) versus agonistas + antagonista (L-arginina).

5.2.2 Envolvimento do sistema imidazólico

A figura 13 mostra que o pré-tratamento dos animais com efaroxan (1 mg/kg, i.p.), mas não com idazoxan (3 mg/kg, i.p.), reverteu de forma significativa a nocicepção causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) e pela clonidina (0,1 mg/kg, i.p.).

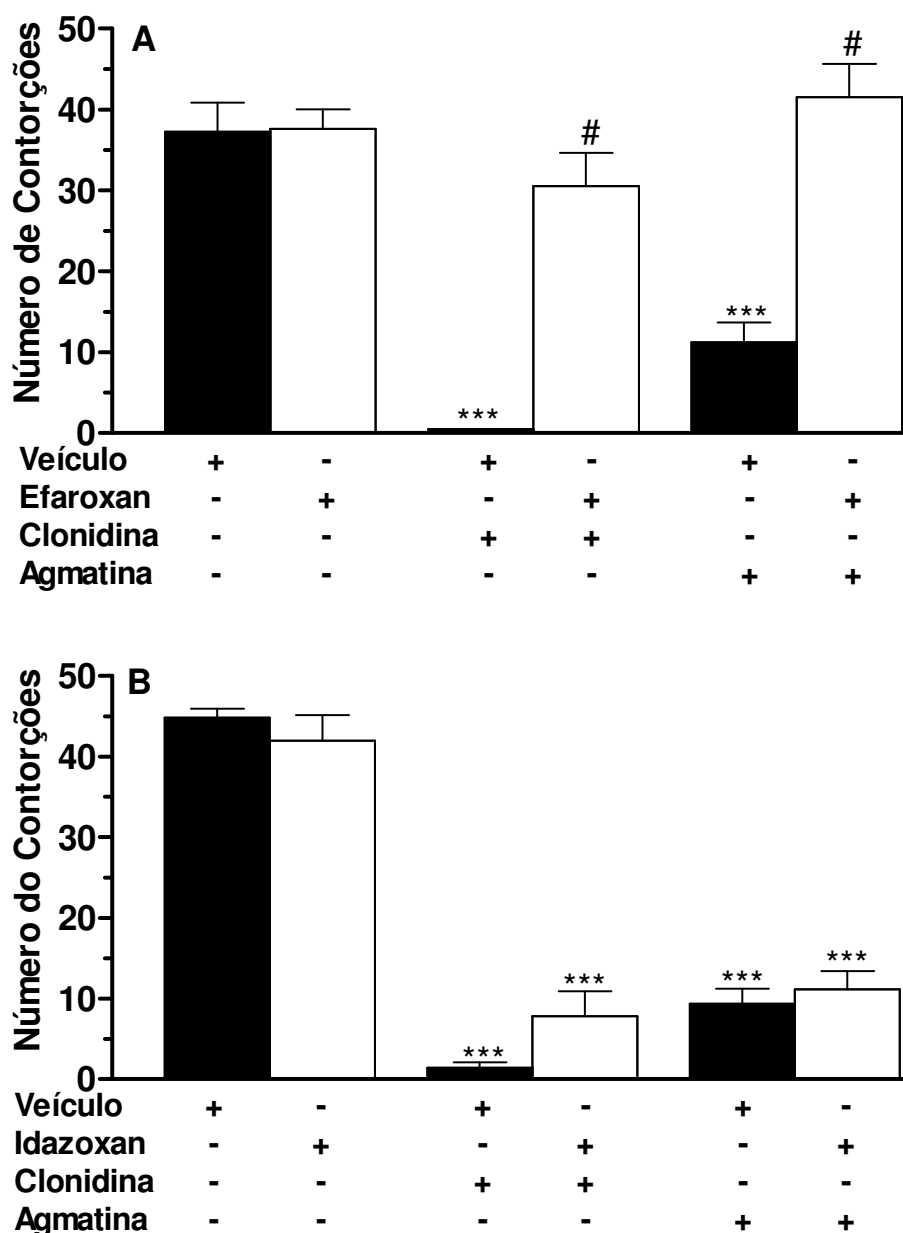


Figura 13: Influência do pré-tratamento dos camundongos com efaroxan (A) (1 mg/kg, i.p.) ou idazoxan (B) (3 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo da agmatina (10 mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. *** P < 0,001 difere significativamente dos grupos controles (veículo, efaroxan e idazoxan) e # P < 0,01 difere significativamente dos grupos dos animais tratados com os agonistas (clonidina e agmatina) versus agonistas + antagonistas (efaroxan e idazoxan).

5.2.3 Envolvimento do sistema alfa (α)₂-adrenérgico

O pré-tratamento dos animais com ioimbina (0,15 mg/kg, i.p.), reverteu significativamente o efeito antinociceptivo da agmatina (10 mg/kg, i.p.) e da clonidina (0,1 mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção causada pelo ácido acético (Fig. 14) .

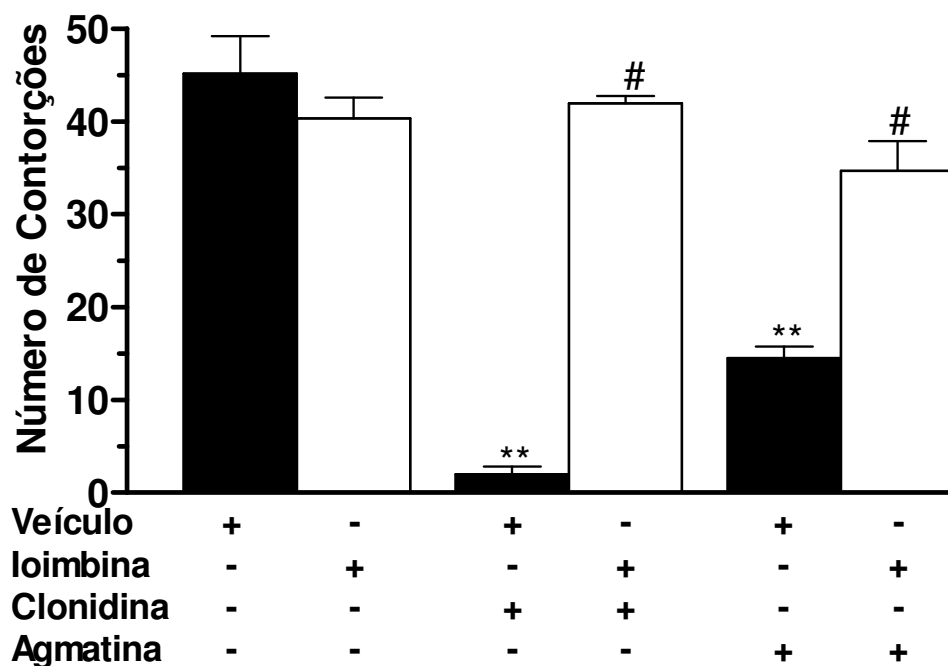


Figura 14: Influência do pré-tratamento dos camundongos com ioimbina (0,15 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo da agmatina (10 mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. ** P < 0,01 difere significativamente dos grupos controles (veículo e ioimbina) e #P < 0,01 difere significativamente dos grupos dos animais tratados com os agonistas (clonidina e agmatina) versus agonistas + antagonista (ioimbina).

5.2.4 Envolvimento do sistema serotoninérgico

Como podemos observar na figura 15, o pré-tratamento dos animais com PCPA, (100 mg/kg/dia, i.p.) durante 4 dias, o qual é capaz de causar uma depleção significativa da concentrações neuronais de serotonina, foi capaz de produzir uma reversão de maneira significativa da antinocicepção causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) no modelo do ácido acético. Além disso, quando os animais foram pré-tratados com cetanserina (0,3 mg/kg, i.p.) ou com ondansetron (0,5 mg/kg, i.p.), mas não com pindolol (1 mg/kg, i.p.), também houve um reversão de maneira significativa da antinocicepção causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) no modelo do ácido acético (Fig. 16).

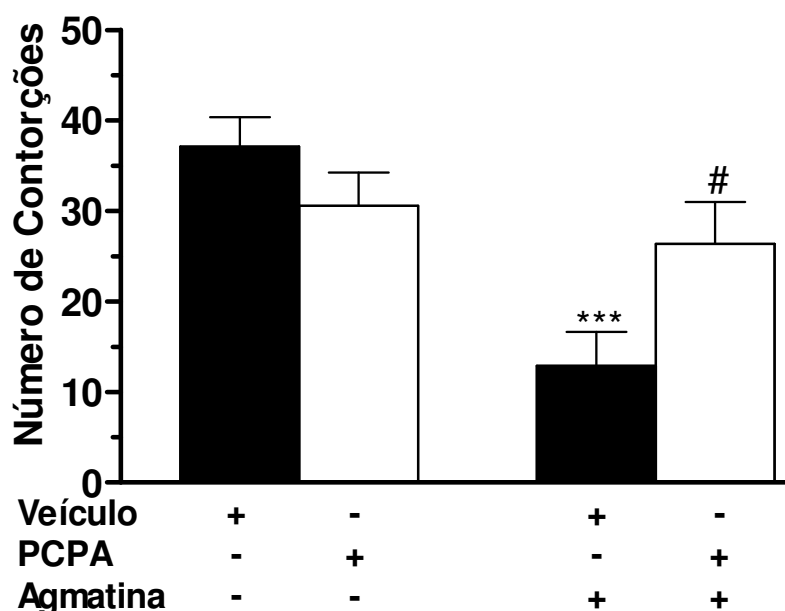


Figura 15: Influência do pré-tratamento dos camundongos com PCPA (100 mg/kg/dia, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo da agmatina (10 mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. *** $P < 0,001$ difere significativamente dos grupos controles (veículo e PCPA) e # $P < 0,01$ difere significativamente do grupo dos animais tratados com o agonista (agmatina) versus agonista + antagonista (PCPA).

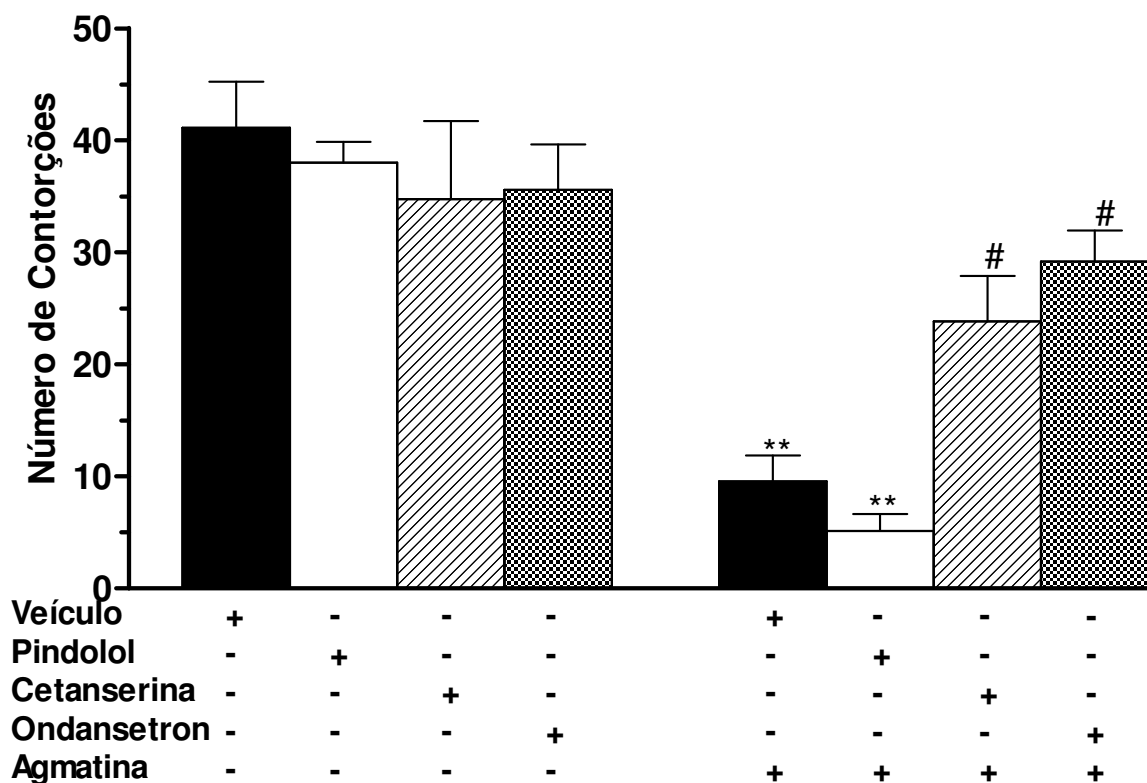


Figura 16: Influência do pré-tratamento dos camundongos com pindolol, (1 mg/kg, i.p.), cetanserina (0,3 mg/kg, i.p.) ou ondansetron (0,5 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo da agmatina (10 mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. ** P < 0,01 difere significativamente dos grupos controles (veículo, pindolol, cetanserina e ondansetron) e # P < 0,01 difere significativamente dos grupos dos animais tratados com o agonista (agmatina) versus agonista mais antagonistas (pindolol, cetanserina e ondansetron).

5.2.5 Envolvimento do sistema opióide

A figura 17 mostra que o pré-tratamento dos animais com naloxona (1 mg/kg, i.p.), também foi capaz de reverter de forma significativa a antinocicepção causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) e pela morfina (5 mg/kg, s.c.).

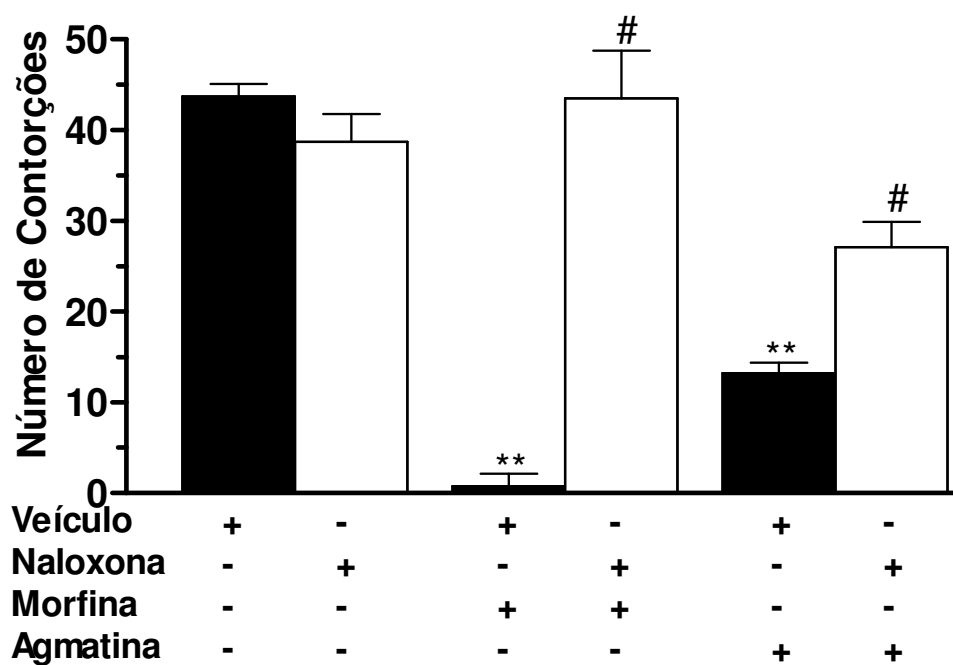


Figura 17: Influência do pré-tratamento dos camundongos com naloxona (1 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo da agmatina (10 mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. ** P < 0,01 difere significativamente dos grupos controle (veículo e naloxona) e # P < 0,01 difere significativamente dos grupos dos animais tratados com os agonistas (agmatina e morfina) versus agonistas mais antagonista (naloxona).

5.2.6 Envolvimento da proteína $G_{i/o}$ sensível à toxina pertussis

O pré-tratamento dos animais com toxina pertussis (0,5 $\mu\text{g}/\text{i.t.}$, 7 dias antes), o qual é capaz de produzir uma dessensibilização da proteína $G_{i/o}$, produziu uma reversão de maneira significativa da antinocicepção causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) e pela morfina (1 mg/kg, s.c.) no modelo do ácido acético (Fig. 18).

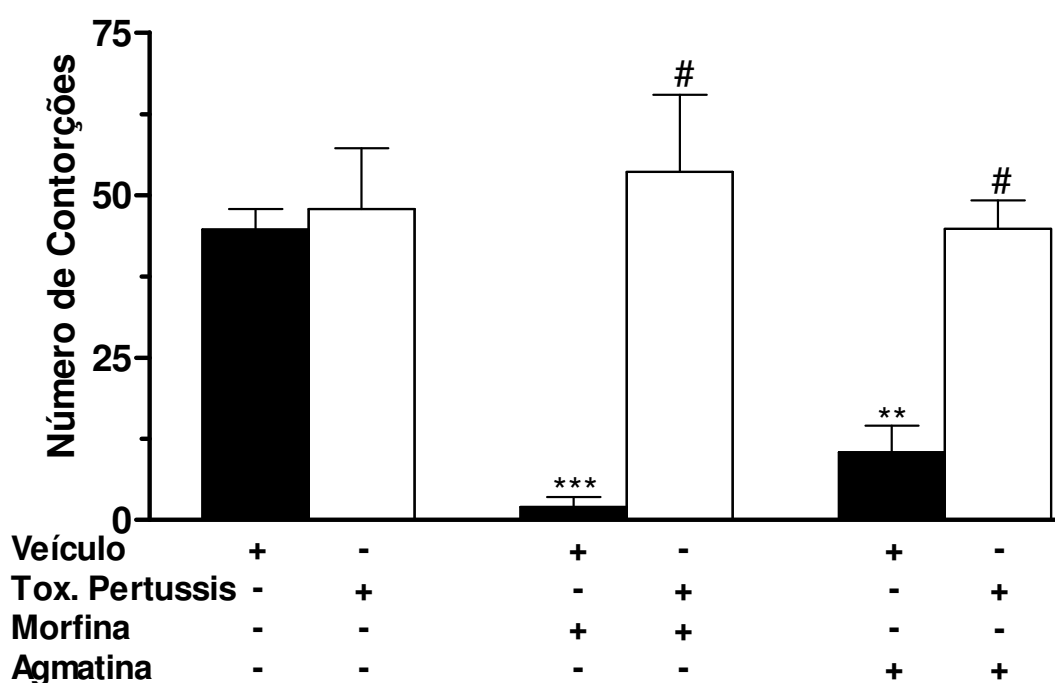


Figura 18: Influência do pré-tratamento dos camundongos com toxina pertussis (0,5 $\mu\text{g}/\text{i.t.}$) sobre o efeito antinociceptivo da agmatina (10 mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético 0,6%. Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ difere significativamente dos grupos controle (veículo e toxina pertussis) e # $P < 0,01$ difere significativamente dos grupos dos animais tratados com os agonistas (agmatina e morfina) versus agonista + antagonista (toxina pertussis).

5.2.7 Envolvimento de canais de cálcio

Como podemos observar na figura 19, o pré-tratamento dos animais com CaCl_2 (200 nmol/i.c.v.) produziu uma reversão de maneira significativa da antinocicepção causada pela agmatina (10 mg/kg, i.p.) e pela bupirone (2,5 mg/kg, i.p.), no entanto, o pré-tratamento com EGTA (30 nmol/i.c.v) não alterou a resposta antinociceptiva da agmatina no modelo do ácido acético.

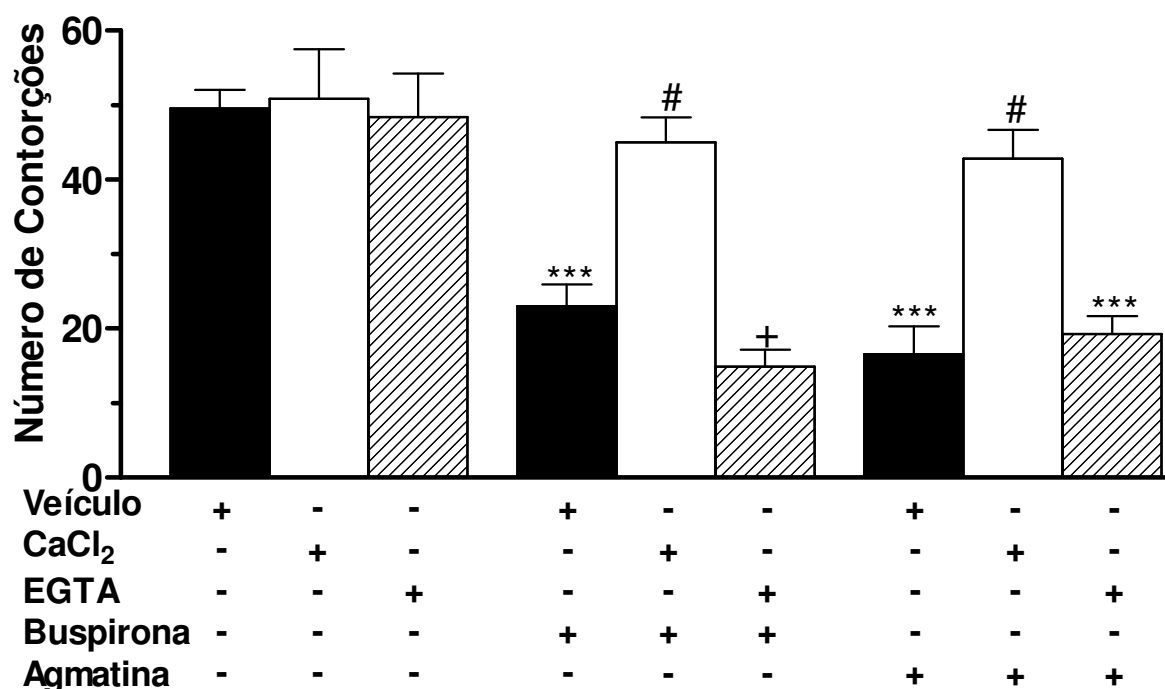


Figura 19: Influência do pré-tratamento dos camundongos com CaCl_2 (200 nmol/i.c.v.) ou EGTA (30 nmol/i.c.v), sobre o efeito antinociceptivo da agmatina (10 mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. *** $P < 0,001$ difere significativamente dos grupos controles (veículo, CaCl_2 e EGTA); # $P < 0,01$ difere significativamente dos grupos dos animais tratados com os agonistas (agmatina e bupirone) versus agonistas + antagonista (CaCl_2) e + $P < 0,05$ difere significativamente dos grupos dos animais tratados com bupirone versus bupirone + EGTA.

5.2.8 Envolvimento das fibras-C sensíveis à capsaicina:

O tratamento neonatal dos animais com capsaicina (50 mg/kg, s.c.), em dose capaz de produzir uma degeneração da maior parte das fibras sensoriais (fibras C e A δ), produziu parcial, mas significativa inibição ($20\pm 5\%$) da nocicepção produzida pelo ácido acético. No entanto, o pré-tratamento com capsaicina, não alterou o efeito antinociceptivo da agmatina (10 mg/kg, i.p.) quando comparado com o grupo tratado com salina no período neonatal (Fig. 20). O sucesso do tratamento neonatal com capsaicina foi confirmado por uma significativa redução das respostas oculares relacionadas à aplicação tópica de solução de capsaicina de acordo com o método anteriormente descrito (HAMMOND e RUDA, 1991; IKEDA et al., 2001).

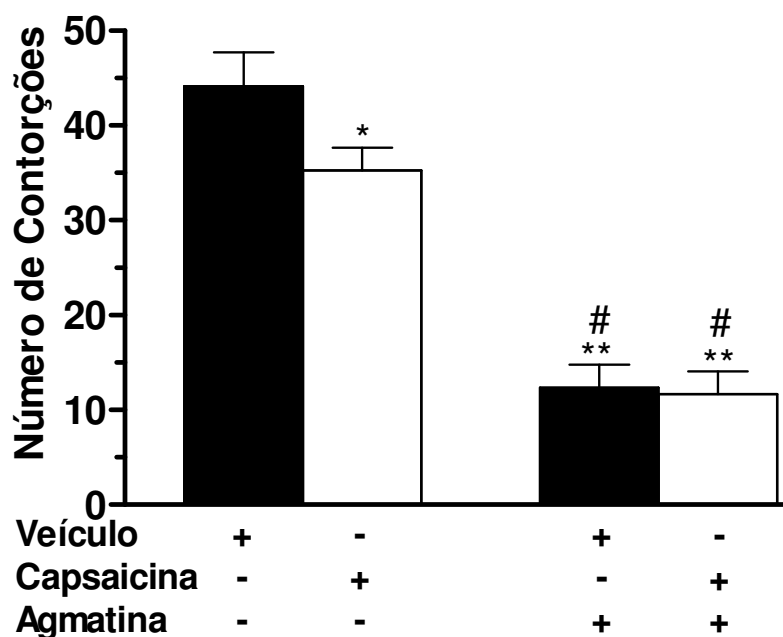


Figura 20: Influência do pré-tratamento neonatal dos camundongos com capsaicina (50 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo da agmatina (10 mg/kg, i.p.) em relação à nocicepção induzida pelo ácido acético (0,6%). Cada grupo representa a média de 8-12 animais e as barras verticais indicam os E.P.M. * P < 0,05; ** P < 0,01 difere significativamente dos grupos controles (veículo e capsaicina) e # P < 0,01 difere significativamente do grupo controle capsaicina.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, demonstrou-se que a administração sistêmica de agmatina foi capaz de produzir significativo efeito antinociceptivo quando analisada em diferentes modelos de nocicepção química em camundongos. Os dados mais relevantes deste estudo foram que, (1) a agmatina administrada sistemicamente (i.p. ou v.o.) causou inibição de forma significativa e dependente da dose do número das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, sendo que, quando administrada pela via i.p. seu efeito permaneceu significativo por até 4 h após sua administração; (2) a injeção i.p. de agmatina causou significante inibição tanto da nocicepção de origem neurogênica (fásica) quanto da nocicepção de origem inflamatória (tônica) causada pela injeção i.pl. de formalina. Além disso, também inibiu a nocicepção neurogênica induzida pela injeção i.pl. de capsaicina, um agonista dos receptores vanilóides; (3) a agmatina ainda foi capaz de produzir efeito tanto profilático quanto terapêutico em relação à nocicepção induzida pela formalina; (4) a resposta nociceptiva causada pela injeção intraplantar de glutamato também foi inibida pela agmatina; (5) a ação antinociceptiva da agmatina quando analisada no modelo do ácido acético foi significativamente revertida pelo pré-tratamento dos animais com L-arginina, efaroxan, ioimbina, PCPA, cetanserina, ondansetron, naloxona, toxina pertussis e CaCl_2 , mas não pelo pindolol e idazoxan; e (6) o pré-tratamento dos animais com EGTA e o tratamento neonatal com capsaicina não alterou de maneira significativa a antinocicepção causada pela agmatina.

Um considerável número de estudos, têm sugerido que a agmatina modula a liberação de transmissores e hormônios, possivelmente atuando como um neurotransmissor ou neuromodulador no sistema nervoso, exercendo assim, papel de fundamental importância em vários processos fisiológicos em mamíferos (para revisão ver REIS e REGUNATHAN,

2000; RAASCH et al., 2001). A agmatina possui varias ações neuromodulatórias importantes, como sua capacidade de potencializar a analgesia causada pela morfina em vários modelos de nocicepção, inclusive àquela causada por inflamação, proteger contra lesão neuronal isquêmica, além de reduzir a tolerância, dependência e os sintomas de retirada induzidos pelo álcool e pela morfina (KOLESNIKOV et al., 1996; LI et al., 1999; ARICIOGLU-KARTAL e REGUNATHAN, 2002; ARICIOGLU et al., 2004). Tem se demonstrado ainda, que a agmatina reduz a resposta nociceptiva causada por inflamação, lesão de nervo espinhal e neuropatia (HORVÁTH et al., 1999; FAIRBANKS et al., 2000; ARICIOGLU-KARTAL et al., 2003; HOU et al., 2003; KARADAG et al., 2003; ÖNAL et al., 2003; YU et al., 2003; KEKESI et al., 2004). Em relação à neuropatia, tem sido demonstrado que a agmatina é capaz de reverter a alodínia e a hiperalgesia em três modelos de dor neuropática: ligação de nervo espinhal ou ciático e na neuropatia diabética induzida pela estreptozotocina em ratos (FAIRBANKS et al., 2000; KARADAG et al., 2003; ÖNAL et al., 2003; YU et al., 2003). No entanto, apesar do considerável número de estudos relacionados ao efeito antinociceptivo da agmatina em diferentes modelos animais, os mecanismos subjacentes a sua ação antinociceptiva, quando administrada sistemicamente, não estão completamente compreendidos.

No presente estudo foi possível obter avanços significativos acerca dos mecanismos de ação responsáveis pela atividade antinociceptiva da agmatina em camundongos. Desta forma, os resultados apresentados neste trabalho indicam pela primeira vez, ao nosso conhecimento, que a administração de agmatina pelas vias i.p. ou v.o, em doses que não produzem qualquer disfunção motora ou efeito colateral detectável, causou uma antinocicepção significativa e dependente da dose quando avaliada no modelo de nocicepção visceral induzida pelo ácido acético. Contudo, a agmatina foi aproximadamente 26 vezes

mais potente, em nível de DI_{50} , em prevenir a nocicepção causada pelo ácido acético quando administrada pela via intraperitoneal em comparação com a via oral. O modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos é descrito como um modelo típico de nocicepção inflamatória visceral sendo amplamente utilizado como ferramenta para detecção e avaliação de novos agentes com propriedades analgésicas e antiinflamatórias. Além disso, a injeção de ácido acético na cavidade peritoneal de camundongos promove a liberação de diversos mediadores conhecidos da resposta inflamatória, tais como as prostaglandinas, bradicinina, $TNF\alpha$, $IL-1\beta$, entre outros (VINEGAR et al., 1979; TJØLSEN e HOLE, 1997; RIBEIRO et al., 2000; IKEDA et al., 2001). Foi observado ainda que a agmatina, quando administrada pela via i.p., produziu seu efeito antinociceptivo máximo após 30 min da sua administração, efeito este que decresceu de maneira gradual, permanecendo significativo até 4 h após a sua administração. Estes dados estão de acordo com os dados da literatura que mostram que a agmatina injetada pela via i.p. atravessa rapidamente a barreira hematoencefálica de camundongos de maneira dependente da concentração. Além disso, a concentração cerebral de agmatina após sua administração pela via i.p., na dose de 50 mg/kg, foi maior em 1 h do que em 3 h após o tratamento dos animais (PILETZ et al., 2003).

A agmatina, quando administrada pela via i.p, também foi capaz de produzir antinocicepção de forma significativa e dependente da dose da nocicepção de origem neurogênica e inflamatória causada pela injeção i.pl. de formalina. Estas observações estão de acordo com dados prévios da literatura (ÖNAL e SOYKAN, 2001). A dor de origem neurogênica é causada pela ativação direta dos terminais nervosos nociceptivos, enquanto a dor de origem inflamatória é mediada por uma combinação de mecanismos periféricos e mecanismos de sensibilização central na medula espinhal (HUNSKAAR e HOLE, 1987;

TJØLSEN et al., 1992). Tem sido demonstrado que a injeção intraplantar de formalina em roedores produz significativo aumento nos níveis espinais de diferentes mediadores como aminoácidos excitatórios, taquicinas, PGE₂, óxido nítrico, cininas e outros peptídeos (TJØLSEN et al., 1992; MALMBERG e YAKSH 1995, SANTOS e CALIXTO, 1997, SANTOS et al., 1998). Além disso, a administração sistêmica, espinal e supraespinal de antagonistas dos receptores NMDA, inibidores da NOS, antagonistas de receptores para as cininas, opióides, agonistas α_2 -adrenérgicos e AINES foram eficazes em inibir a nocicepção induzida pela formalina. (TJØLSEN et al., 1992; MALMBERG e YAKSH, 1992, 1994, 1995; MOORE et al., 1993; CHAPLAN et al., 1997; SAWAMURA et al., 1999; SANTOS e CALIXTO, 1997; SANTOS et al., 1998). Os resultados do presente estudo também mostraram que a agmatina produz não apenas efeito profilático (tratamento antes do estímulo nocivo), mas também efeito terapêutico (administrada depois da injeção de formalina) neste modelo de nocicepção. Uma possível explicação para tal efeito vem do fato que, a agmatina administrada intraperitonealmente alcança rapidamente o SNC, modulando assim a dor inflamatória causada pela injeção de formalina via neurônios aferentes do tipo C. Assim, estes resultados fornecem dados adicionais para uma possível aplicação da agmatina e de seus análogos no desenvolvimento de novas drogas para o tratamento das dores inflamatórias. De acordo com estes resultados, Fairbanks e colaboradores (2000) também demonstraram que a administração de agmatina pela via intratecal após o processo nociceptivo ter sido estabelecido, foi capaz de reverter a hipersensibilidade (alodínia e hiperalgesia) causada tanto pela dinorfina quanto pela ligação de nervo espinal periférico em camundongos, bem como foi capaz de reverter a hiperalgesia em ratos causada pela carragenina.

Outro resultado interessante deste trabalho foi a constatação, pela primeira vez, que a agmatina administrada intraperitonealmente produziu significativo efeito antinociceptivo de forma dependente da dose quando analisada em relação a nocicepção causada pela capsaicina, efeito semelhante àquele observado em relação a primeira fase (neurogênica) da nocicepção induzida pela formalina. No entanto, a agmatina foi 3,2 vezes mais potente em inibir a nocicepção de origem neurogênica causada pela formalina quando comparada com aquela causada pela capsaicina. Tem sido mostrado que a capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida), a substância ativa encontrada em pimentas vermelhas, é uma valiosa ferramenta farmacológica para o estudo de drogas que atuam modulando a transmissão nociceptiva em mamíferos através dos neurônios sensoriais primários do tipo C e Aδ (para revisão ver HOLZER, 1991; JANCSO, 1992). Além disso, tem sido proposto que a nocicepção induzida pela capsaicina é mediada pela ativação de seu receptor específico conhecido como receptor vanilóide (VR) (TRPV₁), um canal catiônico não seletivo ativado por ligante encontrado em neurônios sensoriais primários (SZALLASI e BLUMBERG, 1993; CATERINA et al., 1997; TOMINAGA et al., 1998). Estudos têm demonstrado que a capsaicina promove a liberação de neuropeptídeos, aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato), óxido nítrico e mediadores inflamatórios na periferia, transmitindo assim a informação nociceptiva para a medula espinhal (SZALLASI e BLUMBERG, 1993; SANTOS e CALIXTO, 1997; SAKURADA et al., 1996, 2003).

Nossos resultados também demonstram que a administração intraperitoneal de agmatina produziu uma inibição significativa e de forma dependente da dose da resposta nociceptiva causada pela injeção intraplantar de glutamato na pata de camundongos. O glutamato e seus receptores compreendem o sistema de neurotransmissores excitatórios mais importantes do sistema nervoso de mamíferos. Além disso, está bem estabelecido na

literatura que o sistema glutamatérgico desempenha um importante papel nos processos nociceptivos tanto em nível central quanto periférico (OZAWA et al., 1998; MILLAN, 1999; FUNDYTUS, 2001). Os receptores de glutamato são divididos em duas classes distintas. Os receptores glutamatérgicos “ionotrópicos” são aqueles acoplados a canais iônicos, podendo ainda ser subdivididos em três tipos distintos conforme sua permeabilidade a íons e ativação por ligantes, são eles: N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA) e cainato. Por outro lado, os receptores glutamatérgicos “metabotrópicos” são acoplados a proteína G, modulando assim a subsequente formação de segundos mensageiros e mediadores intracelulares como o NO (OZAWA et al., 1998; FUNDYTUS, 2001). Além disso, dados da literatura demonstram que substâncias capazes de bloquear os receptores glutamatérgicos tanto ionotrópicos quanto metabotrópicos, apresentam importante efeito antinociceptivo em diferentes espécies de mamíferos, inclusive em humanos (LUTFY et al., 1997; NEUGEBAUER, 2002; WIECH et al., 2004). Recentemente, Beirith e colaboradores (2002) verificaram que a resposta nociceptiva induzida pela injeção intraplantar de glutamato parece envolver sítios de ação periférico, espinhal e supraespinhal, sendo amplamente mediada tanto por receptores NMDA quanto não-NMDA, bem como pela liberação de óxido nítrico (NO) ou por substâncias relacionadas ao NO.

Recentemente, dados não publicados do nosso laboratório (resultados não mostrados), demonstram que a administração i.p. de agmatina foi capaz de reduzir de forma significativa e dependente da dose a resposta nociceptiva causada pela injeção intratecal de glutamato, confirmando assim o experimento anterior e mostrando que a atividade antinociceptiva da agmatina ocorre em nível central. A agmatina, administrada pela via i.p., ainda foi capaz de inibir significativamente e de forma dependente da dose a nocicepção causada pela injeção

intratecal de NMDA, mostrando o envolvimento dos receptores NMDA, em nível espinhal, na sua ação antinociceptiva (resultados não mostrados). Além disso, a agmatina inibiu de maneira significativa e dependente da dose a nocicepção induzida pela injeção i.t. de trans-ACPD (agonista metabotrópico), mostrando pela primeira vez, ao nosso conhecimento, a participação dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos na antinocicepção causada pela agmatina, o que pode ser explicado pelo fato de que a via de transdução de sinal intracelular causada pela ativação dos receptores glutamatérgicos metabotrópicos do tipo I é mediada pela ativação de uma proteína Gq que causa ativação da PLC, formação de inositoltrifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), com conseqüente mobilização intracelular de cálcio e ativação da NOS (Fig. 21) (MELDRUM, 2000). Além disso, foi observado que o perfil de antinocicepção causada pela agmatina, em relação aos modelos de nocicepção induzida pela injeção intratecal de agonistas glutamatérgicos, foi muito semelhante à antinocicepção causada tanto pelo MK-801 (um conhecido antagonista não-competitivo dos receptores glutamatérgicos do subtipo NMDA) quanto pela L-NOARG (um conhecido inibidor da sintase do óxido nítrico) (resultados não mostrados). De fato, inibidores da síntese de NO e antagonistas de receptores glutamatérgicos ionotrópicos tanto NMDA quanto não-NMDA são eficazes em inibir a resposta nociceptiva causada pelo ácido acético, capsaicina e formalina (DAVIDSON et al., 1997; LARSON et al., 2000; DOURSOUT et al., 2003). Desta forma, estes dados parecem estar de acordo com os dados da literatura, os quais demonstram que a agmatina exerce um bloqueio sobre os receptores NMDA e inibe a enzima NOS (GALEA et al., 1996; YANG e REIS 1999; REIS e REGUNATHAN, 2000; RAASCH et al., 2001; WEISINGER, 2001; BERKELS et al., 2004).

O presente estudo confirmou que a via da L-arginina-óxido nítrico realmente está envolvida na sua ação antinociceptiva. Esta conclusão deriva do fato que o pré-tratamento

dos animais com o substrato para a NOS, a L-arginina, em uma dose na qual não produziu nenhum efeito *per se* no modelo do ácido acético, mas que reverte significativamente a antinocicepção causada pelo inibidor da sintase do NO, L-NOARG, também inibiu significativamente a atividade antinociceptiva da agmatina. Ao contrário, o pré-tratamento dos animais com D-arginina (isômero inativo da L-arginina), não foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo da agmatina e da L-NOARG no modelo do ácido acético. Por isso, a agmatina deve exercer seu efeito antinociceptivo por atuar, pelo menos em parte, em sistemas de receptores em nível central modulando a ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos e metabotrópicos e inibindo a sintase do óxido nítrico, explicando assim alguns dos seus efeitos, tais como sua capacidade de produzir antinocicepção nos modelos utilizados no presente trabalho e em modelos experimentais de dor neuropática e inflamatória (HORVÁTH et al., 1999; FAIRBANKS et al., 2000; ARICIOGLU-KARTAL et al., 2003; HOU et al., 2003; KARADAG et al., 2003; ÖNAL et al., 2003; YU et al., 2003; KEKESI et al., 2004).

Tem sido demonstrado que a agmatina se liga a todas as subclasses de receptores α_2 -adrenérgicos e sítios de ligação imidazólicos (I), sendo que, em córtex de ratos ela tem uma maior afinidade pelos sítios imidazólicos (LI et al., 1994; PILETZ et al., 1996; EGLEN et al., 1998; REIS e REGUNATHAN, 2000; RAASCH et al., 2001). No presente trabalho, o envolvimento dos receptores α_2 -adrenérgicos no efeito antinociceptivo da agmatina no modelo do ácido acético é sugerido levando em conta os resultados que mostram que o pré-tratamento dos animais com ioimbina, a qual não se liga aos receptores imidazólicos, ou tem 1000 vezes mais afinidade pelos receptores α_2 -adrenérgicos sobre os receptores imidazólicos (PILETZ et al., 1996, EGLEN et al., 1998), reverteu significativamente o efeito antinociceptivo da clonidina e também o da agmatina no modelo do ácido acético. Tais

resultados sugerem fortemente que a ação antinociceptiva da agmatina está relacionada com uma interação com os receptores α_2 -adrenérgicos. Além disso, os resultados do presente trabalho fornecem evidências consistentes sobre o envolvimento dos receptores imidazólicos I_1 na antinocicepção causada pela agmatina, tais evidências vem do fato de que o efaroxan (antagonista preferencial do receptor I_1) (EGLEN et al., 1998), em uma dose que é capaz de prevenir a antinocicepção induzida pelo agonista I_1 , monoxidina (FAIRBANKS e WILCOX, 1999; SHANNON e LUTZ, 2000), reverteu de forma significativa a antinocicepção causada pela agmatina e pela clonidina no modelo do ácido acético. No entanto, o antagonista preferencial dos receptores imidazólicos I_2 , idazoxan, na mesma dose e esquema de tratamento na qual foi eficaz em antagonizar a resposta mediada pela ativação dos receptores I_2 (SANCHEZ-BLAZQUEZ et al., 2000; LU et al., 2003), falhou em prevenir a antinocicepção causada pela agmatina e pela clonidina no modelo do ácido acético. Deve-se levar em conta que o efaroxan tem baixa afinidade pelos receptores α_2 -adrenérgicos, já que possui 40 vezes mais afinidade para os receptores I_1 (EGLEN et al., 1998). Outro aspecto importante é o fato de que a clonidina tem maior afinidade para os receptores I_1 que os receptores I_2 (EGLEN et al., 1998; FAIRBANKS e WILCOX, 1999) e que a agmatina tem baixa afinidade para os receptores I_2 quando comparado com ligantes seletivos desde receptor (RAASCH et al., 2002). Considerando o presente dado, pode-se especular que a ação antinociceptiva da agmatina está provavelmente relacionada com uma interação com os receptores imidazólicos I_1 . No entanto, os receptores I_2 também estão envolvidos na modulação da nocicepção, pelo fato que são responsáveis pela potencialização da analgesia causada pela morfina em vários modelos de nocicepção, bem como pela redução da tolerância, dependência e sintomas de retirada relacionados à morfina e ao álcool, além disso, estão envolvidos na proteção contra lesão neuronal isquêmica (KOLESNIKOV et al., 1996;

UZBAY et al., 2000; ARICIOGLU-KARTAL e REGUNATHAN, 2002; ARICIOGLU et al., 2004).

Está bem estabelecido que as vias serotoninérgicas no SNC originam-se dos núcleos da rafe, os quais representam em mamíferos rica fonte de serotonina neuronal (FIELDS et al., 1991; MILLAN, 2002). O núcleo dorsal da rafe (DRN) tem sido implicado nos efeitos regulatórios de antidepressivos nos transtornos de humor (ARTIGAS et al., 1996), bem como na modulação da dor (MILLAN, 2002) e o núcleo magno da rafe (MRN) é provavelmente o núcleo serotoninérgico mais importante em modular o controle descendente da transmissão da dor (BASBAUM e FIELDS, 1984; MILLAN, 2002). Além disso, vários estudos clínicos e pré-clínicos têm demonstrado que medicamentos antidepressivos são capazes de produzir marcante analgesia tanto em humanos quanto em animais (para revisão ver CARTER e SULLIVAN, 2002, MILLAN, 2002). Recentemente, demonstrou-se que a agmatina produz significativo efeito antidepressivo no teste do nado forçado e no teste de suspensão da cauda em camundongos por um mecanismo que parece envolver uma interação com receptores NMDA, com a via da L-arginina-óxido nítrico e com receptores α_2 -adrenérgicos (ZOMKOWSKI et al., 2002). Com isso, o mecanismo de ação antidepressiva da agmatina parece ser semelhante aos descritos no presente trabalho. Zomkowski e colaboradores (2004) também demonstraram que o efeito antidepressivo da agmatina no teste do nado forçado em camundongos parece ser mediado por uma interação com receptores serotoninérgicos dos subtipos 5-HT₁ e 5-HT₂. Estes dados analisados em conjunto permitem sugerir que o sistema serotoninérgico certamente está envolvido tanto na ação antinociceptiva (presente trabalho) quanto na atividade antidepressiva (ZOMKOWSKI et al., 2004) da agmatina em camundongos. Esta afirmação é sustentada pela observação de que (1) a depleção de serotonina endógena com PCPA, inibidor da triptofano hidroxilase, em dose capaz de

diminuir os níveis cerebrais de serotonina e reverter a antinocicepção causada pela morfina (PINI et al., 1996; MENDES et al., 2000; SANTOS et al., 1999), foi capaz de reverter de maneira significativa o efeito antinociceptivo da agmatina e (2) os antagonistas seletivos dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A} e 5-HT₃, cetanserina e ondansetron, respectivamente, também causaram reversão significativa do efeito antinociceptivo da agmatina quando analisado no modelo do ácido acético. No entanto, os receptores 5-HT_{1A/B} parecem não estar envolvidos no efeito antinociceptivo da agmatina, tendo em vista que o pindolol, antagonista seletivo dos receptores 5-HT_{1A/B}, na mesma dose (1 mg/kg) e esquema de tratamento no qual antagonizou às respostas mediadas por agonistas desde receptor (TAKESHITA e YAMAGUCHI, 1995), falhou em prevenir a antinocicepção causada pela agmatina no modelo do ácido acético. Existem dados na literatura demonstrando que agonistas dos receptores NMDA, bem como o óxido nítrico, causam inativação da triptofano hidroxilase, diminuindo assim a quantidade de serotonina produzida e conseqüentemente liberada, por neurônios (CALLADO et al., 2000; JOHNSON et al., 1989; KAEHLER et al., 1999; KHUN e ARTHUR Jr, 1997; TAO e AUERBACH, 1996; SEGIETH et al., 2001; SMITH e WHITTON, 2000). Por outro lado, tem se demonstrado que antagonistas dos receptores NMDA e inibidores da NOS, causam ativação da triptofano hidroxilase e subseqüente aumento na liberação de serotonina em algumas regiões do cérebro (CALLADO et al., 2000; JOHNSON et al., 1989; KAEHLER et al., 1999; KHUN e ARTHUR Jr, 1997; TAO e AUERBACH, 1996; SEGIETH et al., 2001; SMITH e WHITTON, 2000). Com isso pode-se especular que a agmatina atuando diretamente como antagonista do receptor NMDA e inibidor da NOS pode causar aumento da quantidade de serotonina endógena, a qual modula a transmissão nociceptiva por interagir com os receptores 5-HT_{2A} e 5-HT₃. Uma outra

possibilidade é que a agmatina interaja diretamente com os receptores 5-HT_{2A} e 5-HT₃. No entanto, estudos adicionais são necessários para confirmação desta hipótese.

O presente trabalho também demonstra que o sistema opióide está envolvido na ação antinociceptiva da agmatina, pois a naloxona, antagonista não seletivo dos receptores opióides, inibiu completamente o efeito antinociceptivo da agmatina e da morfina. No entanto, foi demonstrado por Li e colaboradores (1999), que a agmatina não inibe o *binding* de [³H]naloxona nos receptores opióides. Com bases nesses dados, pode-se sugerir que a agmatina deve exercer um efeito antinociceptivo devido a liberação de opióides endógenos, e não por interagir diretamente com receptores opióides. Contudo, esta hipótese merece estudos posteriores.

A participação da proteína G_{i/o} na ação antinociceptiva da agmatina é confirmada pelo fato que o pré-tratamento dos animais com toxina pertussis, em dose capaz de inibir a proteína G_{i/o}, foi capaz de reverter completamente o efeito antinociceptivo da agmatina e da morfina no modelo do ácido acético em camundongos. Dados da literatura mostram claramente que toxina pertussis causa inativação da proteína G_{i/o} por ribosilação da sua subunidade catalítica (DE BOCK et al., 2003; WEN et al., 2003 SAVINAINEN e LAITINEN, 2004). A ativação da proteína G_{i/o} esta associada ao bloqueio dos canais de cálcio dependente de voltagem e ativação dos canais de potássio, resultando em hiperpolarização da membrana neuronal (PERTWEE, 1999; SCHULTZ e GROSS, 2001). Com isso, estes resultados estão em concordância com a hipótese de que a antinocicepção produzida pela agmatina, de maneira semelhante àquela observada para alguns agonistas (por exemplo, morfina, clonidina, adenosina, anandamida, entre outros) envolve um mecanismo relacionado à proteína G_{i/o} sensível à toxina pertussis (DE BOCK et al., 2003; WEN et al., 2003 SAVINAINEN e LAITINEN, 2004).

Recentemente, a literatura especializada tem dado destaque à importância dos canais de cálcio dependente de voltagem (CCDVs) no controle e transmissão da dor (SAEGUSA et al., 2002). Além disso, bloqueadores de diferentes tipos de CCDVs foram eficazes em inibir a nocicepção em modelos de dor inflamatória e neuropática (VANEGAS e SCHAIBLE, 2000; SAEGUSA et al., 2001; 2002). O influxo de íons Ca^{2+} através dos CCDVs, controla inúmeras funções celulares, pois é capaz de converter sinais elétricos em sinais bioquímicos intracelulares responsáveis pelo controle de inúmeras atividades neuronais, tais como liberação de neurotransmissores e expressão gênica (HOFMANN et al., 1999; CATTERALL, 2000). Neste sentido, o presente estudo confirmou que os canais de cálcio estão envolvidos, pelo menos em parte, na ação antinociceptiva da agmatina, pois o pré-tratamento dos animais com CaCl_2 foi capaz de reverter completamente o efeito antinociceptivo da agmatina e da buspirona, confirmando assim os dados da literatura que demonstram que agmatina é capaz de bloquear diferentes tipos dos canais de cálcio dependentes de voltagem (WENG et al., 2003; ZHENG et al., 2004).

Tem sido documentado que a via de transmissão mais importante para dor inflamatória é aquela que compreende os receptores periféricos polimodais ao redor de pequenos vasos que sinalizam ao SNC via neurônios aferentes do tipo C, chegando assim ao corno dorsal da medula espinhal (KUMAZAWA et al., 1996). Neste sentido, nossos resultados mostram que o tratamento neonatal dos animais com capsaicina, em dose conhecida por produzir uma degeneração da maioria das fibras não mielinizadas do tipo C que sinalizam ao SNC (HOLZER, 1991; JANCÓS, 1992), inibiu significativamente o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. No entanto, o mesmo tratamento com capsaicina não foi capaz de modificar a antinocicepção causada pela agmatina, quando comparado com o grupo tratado com o veículo utilizado para dissolver a

capsaicina. Com isso, pelo menos em camundongos, as fibras sensoriais do tipo C sensíveis a capsaicina não parecem estar envolvidas na antinocicepção causada pela agmatina.

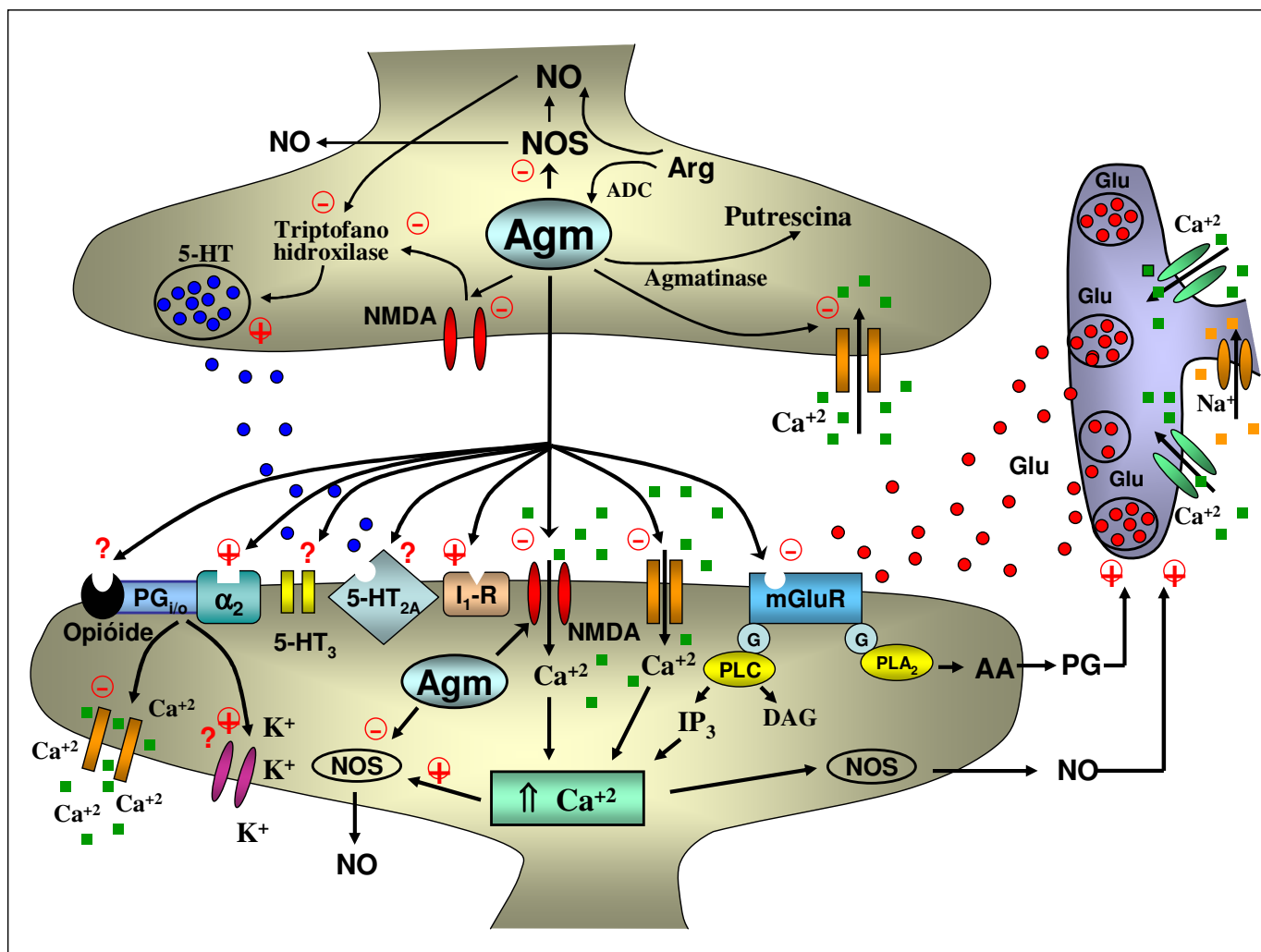


Figura 21: Mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva da agmatina observados neste estudo. + significa estimula e – significa inibe. Adaptado de Reis e Regunathan, 2001. Vários mecanismos parecem estar envolvidos na ação antinociceptiva da agmatina tais como: (1) sua habilidade de bloquear os receptores NMDA e inibir a NOS; (2) ativação os receptores α_2 -adrenérgicos e imidazólicos I_1 ; (3) envolvimento dos sistemas opióide e serotoninérgico (através dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT₃) os quais parecem participar de forma indireta pelo fato que a agmatina atuando sobre os receptores NMDA, NOS e receptores α_2 -adrenérgicos pode causar liberação de serotonina e opióides endogenamente; (4) e o envolvimento dos canais de cálcio e da proteína G_{i/o} inibitória.

Em conclusão, os resultados do presente trabalho fornecem evidências de que a agmatina, administrada pela via intraperitoneal, exerce uma antinocicepção pronunciada, de ação central, rápida e duradoura contra a nocicepção induzida pelo ácido acético, formalina, capsaicina e glutamato, em doses nas quais não interferem na atividade locomotora dos camundongos. Vários mecanismos parecem estar envolvidos na ação antinociceptiva da agmatina (ver figura 21) tais como (1) sua habilidade de bloquear os receptores NMDA e inibir a sintase do óxido nítrico; (2) ativação dos receptores α_2 -adrenérgicos e imidazólicos I_1 ; (3) envolvimento dos sistemas opióide e serotoninérgico (através dos receptores 5-HT_{2A} e 5-HT₃), os quais parecem participar de forma indireta, pelo fato de que a agmatina atuando sobre os receptores NMDA, NOS e receptores α_2 -adrenérgicos poderia causar a liberação de serotonina e opióides endogenamente; (4) e o envolvimento dos canais de cálcio e da proteína G_{i/o} inibitória. No entanto, os receptores serotoninérgicos 5-HT₁ ou imidazólicos I_2 e as fibras C não mielinizadas, não parecem estar envolvidos na sua ação antinociceptiva. Desta forma, o desenvolvimento de substâncias capazes de modular sistemas de neurotransmissores ou neuromoduladores endógenos envolvidos no controle da dor, sem efeitos colaterais importantes, seria capaz de diminuir o sofrimento de milhares de pessoas que sofrem por causa da falta de uma terapia realmente eficiente contra os diversos tipos de dores clínicas observadas em humanos, principalmente àquelas crônicas e neuropáticas.

7. REFERÊNCIAS

- Alberti K, Woods H, Whalley M. 1973. Mechanism of action of the monoguanidine hypoglaemic agents, galegine and agmatina. **Eur. J. Clin. Invest.** 3: 208.
- Aricioglu F, Altunbas H. 2003. Is agmatine an endogenous anxiolytic/antidepressant agent? **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1009: 136-140.
- Aricioglu-Kartal F, Regunathan S. 2002. Effect of chronic morphine treatment on the biosynthesis of agmatine in rat brain and others tissues. **Life Sci.** 71: 1695-1701.
- Aricioglu-Kartal F, Korcegez E, Bozkurt A, Ozyalcin S. 2003. Effect of agmatine on acute and mononeuropathic pain. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1009: 105-115.
- Aricioglu F, Paul IA, Regunathan S. 2004. Agmatine reduces only peripheral-related behavioral signs, not the central signs, of morphine withdrawal in nNOS deficient transgenic mice. **Neurosci.** 354: 153-157.
- Arteni NS, Lavinsky D, Rodrigues AL, Frison VB, Netto CA. 2002. Agmatine facilitates memory of an inhibitory avoidance task in adult rats. **Neurobiol. Learn. Mem.** 78: 465-469.
- Artigas F, Romero L, De Montigny C, Blier P. 1996. Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. **Trends Neurosci.** 19: 378-383.
- Basbaum AI, Fields HL. 1984. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annu. Rev. Neurosci.** 7: 309-338.

- Beirith A, Santos ARS, Calixto JB. 2002. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Res.** 924: 219-228.
- Beirith A, Santos ARS, Calixto JB. 2003. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. **Brain Res.** 969: 110-116.
- Bell J, Malmberg RT. 1990. Analysis of a cDNA encoding arginine decarboxylase from oat reveals similarity to the *E. coli* arginine decarboxylase and evidence protein processing. **Mol. Genet.** 224: 431-436.
- Berendse HW, Groenewegen HJ. 1991. Restricted cortical termination fields of the midline and intralaminar thalamic nuclei in the rat. **Neuroscience.** 42: 73-102.
- Berkels R, Taubert D, Grundemann D, Schomig E. 2004. Agmatine signaling: odds and threads. **Cardiovasc. Drug Rev.** 22: 7-16.
- Besson JM, Chaouch A. 1987. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Physiol. Rev.** 67: 67-186.
- Besson JM. 1997. The complexity of physiopharmacologic aspects of pain. **Drugs.** 53: 1-9.
- Besson JM. 1999. The neurobiology of pain. **Lancet.** 353: 1610-1615.
- Bhargava VK, Saha L. 2001. Serotonergic mechanism in imipramine induced antinociception in rat tail flick test. **Indian J. Physiol. Pharmacol.** 45 : 107-110.
- Boronat MA, Olmos G, Garcia-Sevilla JA. 1998. Attenuation of tolerance to opioid-induced antinociception and protection against morphine-induced decrease of neurofilament proteins by idazoxan and I₂-imidazoline ligands. **Br. J. Pharmacol.** 125: 175-185.

- Callado LF, Hopwood SE, Hancock PJ, Stamford JA. 2000. Effects of dizocilpine (MK801) on noradrenaline, serotonin and dopamine release and uptake. **Neuroreport** 11: 173-176.
- Carter GT, Sullivan MD. 2002. Antidepressants in pain management. **Curr. Opin. Investig. Drugs**. 3: 454-458.
- Catterall WA. 2000. Structure and function of neuronal Ca^{2+} channels and their role in neurotransmitter release. **Cell. Calcium** 24: 307-323.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**. 389: 816-824.
- Chaplan SR, Malmberg AB, Yaksh TL. 1997. Efficacy of spinal NMDA receptor antagonism in formalin hyperalgesia and nerve injury evoked allodynia in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 280: 829-838.
- Coggeshall RE, Carlton SM. 1997. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. **Brain Res. Rev.** 24: 28-66.
- Craig AD, Dostrovsky JO. 1999. Medulla to thalamus. In: Wall PD, Melzack R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone: Londres. 1-8.
- Davidson EM, Coggeshall RE, Carlton SM. 1997. Peripheral NMDA and non-NMDA glutamate receptors contribute to nociceptive behaviors in the rat formalin test. **Neuroreport**. 8: 941-946.
- De Bock F, Kurz J, Azad SC, Parsons CG, Hapfelmeier G, Zieglansberger W, Rammes G. 2003. Alpha2-adrenoreceptor activation inhibits LTP and LTD in the basolateral amygdala: involvement of Gi/o-protein-mediated modulation of Ca^{2+} -channels and inwardly rectifying K^{+} -channels in LTD. **Eur. J. Neurosci.** 17: 1411-1424.

- Demehri S, Homayoun H, Honar H, Riazi K, Vafaie K, Roushanzamir F, Dehpour AR. 2003. Agmatine exerts anticonvulsant effect in mice: modulation by alpha 2-adrenoceptors and nitric oxide. **Neuropharmacology**. 45: 534-542
- De Vos H, Convents A, De Keyser J, De Backer JP, Van Megen IJ, Ebinger G, Vauquelin G. 1991. Autoradiographic distribution of alpha 2 adrenoceptors, NAIBS, and 5-HT_{1A} receptors in human brain using [³H]idazoxan and [³H]rauwolscine. **Brain Res**. 566: 13-20.
- De Vos H, Bricca G, De Keyser J, De Backer JP, Bousquet P, Vauquelin G. 1994. Imidazoline receptors, non-adrenergic idazoxan binding sites and alpha 2-adrenoceptors in the human central nervous system. **Neuroscience**. 59: 589-598.
- Doursout MF, Liang Y, Chelly JE, 2003. NOS inhibitors exhibit antinociceptive properties in the rat formalin test. **Can. J. Anaesth**. 50: 909-916.
- Dray A. 1997. Peripheral Mediators of Pain. In: Dickenson, A., Besson, J., -M., editors. **The Pharmacology of Pain**. Vol.130/I., Springer: Verlag, Berlin. 21-41
- Dray A, Urban I, Dickenson A, 1994. Pharmacology of chronic pain. **Trends Pharmacol. Sci**. 15: 190-197.
- Dudkowska M, Lai J, Gardini G, Stachurska A, Grzelakowska-Sztabert B, Colombatto S, Manteuffel-Cymborowska M. 2003. Agmatine modulates the in vivo biosynthesis and interconversion of polyamines and cell proliferation. **Biochim. Biophys. Acta**. 1619: 159-166.
- Duman EN, Kesim M, Kadioglu M, Yaris E, Kalyoncu NI. 2004. Possible involvement of opioidergic and serotonergic mechanisms in antinociceptive effect of paroxetine in acute pain. **J. Pharmacol. Sci**. 161-165.

- Eglen RM, Hudson AL, Kendall DA, Nutt DJ, Morgan NG, Wilson VG, Dillon MP. 1998. 'Seeing through a glass darkly': casting light on imidazoline 'I' sites. **Trends Pharmacol. Sci.** 19: 381-390.
- Fairbanks CA, Wilcox GL. 1999. Moxonidine, a selective α_2 -adrenergic and imidazoline receptor agonist, produces spinal antinociception in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 290: 403-412.
- Fairbanks CA, Schreiber KL, Brewer KL, Yu CG, Stone LS, Kitto KF, Nguyen HO, Grocholski BM, Shoeman DW, Kehl LJ, Regunathan S, Reis DJ, Yeziarski RP, Wilcox GL. 2000. Agmatine reverses pain induced by inflammation, neuropathy, and spinal cord injury. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 97: 10584-10589.
- Feng Y, Halaris AE, Piletz JE. 1997. Determination of agmatine in brain and plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.** 691: 277-286.
- Fields HL, Heinricher MM, Mason P. 1991. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. **Annu. Rev. Neurosci.** 14: 219-245.
- Fundytus ME. 2001. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. **CNS Drugs.** 15: 29-58.
- Galea E, Regunathan S, Eliopoulos V, Feinstein DL, Reis DJ. 1996. Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. **Biochem. J.** 316: 247-249.
- Gardini G, Cravanzola C, Autelli R, Testore G, Cesa R, Morando L, Solinas SP, Muzio G, Grillo MA, Colombatto S. 2003. Agmatine inhibits the proliferation of rat hepatoma cells by modulation of polyamine metabolism. **J. Hepatol.** 39: 793-799.

- Gilad GM, Gilad VH, Rabey JM. 1996. Arginine and ornithine decarboxylation in rodent brain: coincidental changes during development and after ischemia. **Neurosci. Lett.** 216: 33-36.
- Gilad GM, Gilad VH. 2000. Accelerated functional recovery and neuroprotection by agmatine after spinal cord ischemia in rats. **Neurosci. Lett.** 296: 97-100.
- Glavin GB, Carlisle MA, Smyth DD. 1995. Agmatine, an endogenous imidazoline receptor agonist, increases gastric secretion and worsens experimental gastric mucosal injury in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 274: 741-744.
- Gründemann D, Hahne C, Berkels R, Schomig E. 2003. Agmatine is efficiently transported by non-neuronal monoamine transporters extraneuronal monoamine transporter (EMT) and organic cation transporter 2 (OCT2). **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 304: 810-817.
- Guirimand F, Le Bars D. 1996. Physiologie de la nociception. **Ann. Fr. Anesth. Réanim.** 15: 1048-1079.
- Guyton AC. 1992. Sensações somáticas: II. Dor, cefaléia e sensações térmicas. In: Guyton AC. **Tratado de fisiologia médica**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro. 458-467.
- Halaris A, Piletz JE. 2001. Imidazoline receptors: Possible involvement in the pathophysiology and treatment of depression. **Hum. Psychopharmacol.** 16: 65-69.
- Hammond DL, Ruda MA. 1991. Developmental alteration in nociceptive threshold, immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P, and fluoride-resistant acid phosphatase in neonatally capsaicin-treated rats. **J. Comp. Neurol.** 312: 436-450.
- Head GA. 2003. Agmatine and Imidazoline Systems: Fourth International Symposium. **Drugs.** 6: 544-547.
- Hill RG. 2001. Molecular basis for the perception of pain. **Neuroscientist.** 7: 282-292.

- Hofmann F, Lacinova L, Klugbauer N. 1999. Voltage-dependent calcium channel: from structure to function. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.** 139: 33-87.
- Holzer P. 1991. Capsaicin as a tool for studying sensory neuron functions. **Adv. Exp. Med. Biol.** 298: 3-16.
- Horváth G, Kékesi G, Dobos I, Szikszay M, Klimscha W, Benedek G. 1999. Effect of intrathecal agmatine on inflammation-induced thermal hyperalgesia in rats. **Eur. J. Pharmacol.** 368: 197-204.
- Hou SW, Qi JS, Zhang Y, Qiao JT. 2003. Spinal antinociceptive effect of agmatine and tentative analysis of involved receptors: study in an electrophysiological model of rats. **Brain Res.** 968: 277-280.
- Hunskar S, Hole K, 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain.** 30: 103-114.
- Ikeda Y, Ueno A, Naraba H, Oh-ishi S. 2001. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanooids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sci.** 69: 2911-2919.
- Jancsó G. 1992. Pathobiological reactions of C-fibre primary sensory neurones to peripheral nerve injury. **Exp. Physiol.** 77: 405-431.
- Johnson M, Hanson GR, Gibb JW. 1989. Effect of MK-801 on the decrease in tryptophan hydroxylase induced by methamphetamine and its methylenedioxy analog. **Eur. J. Pharmacol.** 165: 315-318.
- Jones BE, Yang TZ. 1985. The efferent projections from the reticular formation and the locus coeruleus studied by anterograde and retrograde axonal transport in the rat. **J. Comp. Neurol.** 242: 56-92.
- Julius D, Basbaum AI. 2001. Molecular mechanisms of nociception. **Nature.** 413: 203-210.

- Kaehler ST, Singewald N, Sinner C, Philippu A. 1999. Nitric oxide modulates the release of serotonin in the rat hypothalamus. **Brain Res.** 835: 346-349.
- Kalra SP, Pearson E, Sahu A, Kalra PS. 1995. Agmatine, a novel hypothalamic amine, stimulates pituitary luteinizing hormone release in vivo and hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone release in vitro. **Neurosci. Lett.** 194: 165-168.
- Kamisaki Y, Ishikawa T, Takao Y, Omodani H, Kuno N, Itoh T. 1990. Binding of [³H]p-aminoclonidine two sites, distribution of alpha 2-adrenoceptors and imidazoline binding sites in rat brain. **Brain Res.** 514: 15-21.
- Karadag HC, Ulugol A, Tamer M, Ipci Y, Dokmeci I. 2003. Systemic agmatine attenuates tactile allodynia in two experimental neuropathic pain models in rats. **Neurosci. Lett.** 339: 88-90.
- Kekesi G, Dobos I, Benedek G, Horvath G. 2004. The Antinociceptive potencies and interactions of endogenous ligands during continuous intrathecal administration: adenosine, agmatine, and endomorphin-1. **Anesth. Analg.** 98: 420-426.
- King PR, Gundlach AL, Louis WJ. 1995. Quantitative autoradiographic localization in rat brain of alpha 2-adrenergic and non-adrenergic I-receptor binding sites labeled by [³H]rilmenidine. **Brain Res.** 675: 264-278.
- Kolesnikov Y, Jain S, Pasternak GW. 1996. Modulation of opioid analgesia by agmatine. **Eur. J. Pharmacol.** 296: 17-22.
- Koster R, Anderson M, deBeer EJ. 1959. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.** 18: 412.
- Kribben B, Heller J, Trebicka J, Sauerbruch T, Bruss M, Gothert M, Molderings GJ. 2004. Agmatine (decarboxylated arginine), a modulator of liver cell homeostasis and proliferation. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.** 369: 160-165.

- Kuhn DM, Arthur Jr R. 1997. Molecular mechanism of the inactivation of tryptophan hydroxylase by nitric oxide: Attack on critical sulfhydryls that spare the enzyme iron center. **J. Neurosci.** 17: 7245-7251.
- Kumazawa T, Mizumura K, Koda H, Fukusako H. 1996. EP receptor subtypes implicated in the PGE₂-induced sensitization of polymodal receptors in response to bradykinin and heat. **J. Neurophysiol.** 75: 2361-2368.
- Kuzirian A, Meyhofer E, Hill L, Neary JT, Alkon DL. 1986. Autoradiographic measurement of tritiated agmatine as an indicator of physiologic activity in Hermissenda visual and vestibular neurons. **J. Neurocytol.** 15: 629-643.
- Larson AA, Kovacs KJ, Cooper JC, Kitto KF. 2000. Transient changes in the synthesis of nitric oxide result in long-term as well as short-term changes in acetic acid-induced writhing in mice. **Pain.** 86: 103-111.
- Lavinsky D, Arteni NS, Netto CA. 2003. Agmatine induces anxiolysis in the elevated plus maze task in adult rats. **Behav. Brain Res.** 141: 19-24.
- Li G, Regunathan S, Barrow CJ, Eshragi J, Cooper R, Reis DJ. 1994. Agmatine: An endogenous clonidine-displacing substance in the brain. **Science.** 263: 966-969.
- Li J, Li X, Pei G, Qin BY. 1999. Effects of agmatine on tolerance to and substance dependence on morphine in mice. **Zhongguo Yao Li Xue Bao.** 20: 232-238.
- Li YF, Gong ZH, Cao JB, Wang HL, Luo ZP, Li J. 2003. Antidepressant-like effect of agmatine and its possible mechanism. **Eur. J. Pharmacol.** 469: 81-88.
- Liang JH, Li JX, Wang XH, Chen B, Lu Y, Zhang P, Han R, Ye XF. 2004. L-type calcium channel blockers enhance 5-HTP-induced antinociception in mice. **Acta Pharmacol Sin.** 25: 644-650.

- Loeser JD, Melzack R. 1999. Pain: an overview. **Lancet**. 353: 1607-1609.
- Lu G, Su RB, Li J, Qin BY. 2003. Modulation by alpha-difluoromethyl-ornithine and aminoguanidine of pain threshold morphine analgesia and tolerance. **Eur. J. Pharmacol.** 478: 139-144.
- Lutty K, Cai SX, Woodward RM, Weber E. 1997. Antinociceptive effects of NMDA and non-NMDA receptor antagonists in the tail flick test in mice. **Pain**. 70: 31-40.
- Ma QP, Woolf CJ. 1996. Progressive tactile hypersensitivity: an inflammation-induced incremental increase in the excitability of the spinal cord. **Pain**. 67: 97-106.
- Malmberg RL, Cellino ML. 1994. Arginine decarboxylase of oats is activated by enzymatic cleavage into two polypeptides. **J. Biol. Chem.** 269: 2703-2706.
- Malmberg AB, Yaksh TL. 1992. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 263: 136-146.
- Malmberg AB, Yaksh TL. 1994. Capsaicin-evoked prostaglandin E2 release in spinal cord slices: relative effect of cyclooxygenase inhibitors. **Eur. J. Pharmacol.** 271: 293-299.
- Malmberg AB, Yaksh TL. 1995. The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E2 using microdialysis in conscious rats. **Br. J. Pharmacol.** 114, 1069-1075.
- Meldrum BS. 2000. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J. Nutr.** 130: 1007-1015.
- Mendes GL, Santos ARS, Malheiros A, Filho VC, Yunes RA, Calixto JB. 2000. Assessment of mechanisms involved in antinociception caused by sesquiterpene polygodial. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 292: 164-172.

- Michel MC, Ernsberger P. 1992. Keeping an eye on the I site: imidazoline-preferring receptors. **Trends Pharmacol. Sci.** 35: 324-330.
- Millan MJ. 1999. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.** 57: 1-164.
- Millan MJ. 2002. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.** 66: 355-474.
- Molderings GJ, Kribben B, Heinen A, Schroder D, Bruss M, Gothert M. 2004. Intestinal tumor and agmatine (decarboxylated arginine): low content in colon carcinoma tissue specimens and inhibitory effect on tumor cell proliferation in vitro. **Cancer.** 101: 858-868.
- Moore PK, Wallace P, Gaffen Z, Hart SL, Babbedge RC. 1993. Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitro indazole and related indazoles: antinociceptive and cardiovascular effects. **Br. J. Pharmacol.** 110: 219-224.
- Morgan AD, Campbell UC, Fons RD, Carroll ME. 2002. Effects of agmatine on the escalation of intravenous cocaine and fentanyl self-administration in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 72: 873-880.
- Neugebauer V. 2002. Metabotropic glutamate receptors – important modulators of nociception and pain behavioral. **Pain.** 98: 1-8.
- Nguyen HOX, Goracke-Postle CJ, Kaminski LL, Overland AC, Morgan AD, Fairbanks CA. 2003. Neuropharmacokinetic and dynamic studies of agmatine (descarboxylated arginine). **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 1009: 82-105.
- Nicholas AP, Pieribone VA, Hokfelt T. 1993. Distributions of mRNA for alpha-2 adrenergic receptor subtypes in rat brain: an in situ hybridization study. **J. Comp. Neurol.** 328: 575-594.

- Nicholas AP, Hokfelt T, Pieribone VA. 1996. The distribution and significance of CNS adrenoceptors examined with in situ hybridization. **Trends Pharmacol. Sci.** 17: 245-255.
- Olmos G, DeGregorio-Rocasolano N, Paz Regalado M, Gasull T, Assumpcio Boronat M, Trullas R, Villarroel A, Lerma J, Garcia-Sevilla JA. 1999. Protection by imidazol(ine) drugs and agmatine of glutamate-induced neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells through blockade of NMDA receptor. **Br. J. Pharmacol.** 127: 1317-1326.
- Önal A, Soykan N. 2001. Agmatine produces antinociception in tonic pain in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 69: 93-97.
- Önal A, Delen Y, Ulker S, Soykan N. 2003. Agmatine attenuates neuropathic pain in rats: possible mediation of nitric oxide and noradrenergic activity in the brainstem and cerebellum. **Life Sci.** 73: 413-428.
- Otake K, Ruggiero DA, Regunathan S, Wang H, Milner TA, Reis DJ. 1998. Regional localization of agmatine in the rat brain: an immunocytochemical study. **Brain Res.** 787: 1-14.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K. 1998. Glutamate receptors in mammalian central nervous system. **Prog. Neurobiol.** 54 : 581-618.
- Pertwee, RG. 1999. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. **Curr. Med. Chem.** 6: 635-664.
- Piletz JE, Zhu H, Chikkala D.N. 1996. Comparison of ligand binding affinities at human I1-imidazoline binding sites and the high affinity state of alpha-2 adrenoceptor subtypes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 279: 694-702.
- Piletz JE, May PJ, Wang G, Zhu H. 2003. Agmatine crosses the blood-brain barrier. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 1009: 64-74.

- Pini LA, Sandrini M, Vitale G. 1996. The antinociceptive action of paracetamol is associated with changes in the serotonergic system in the rat brain. **Eur. J. Pharmacol.** 308: 31-40.
- Pleuvry BJ, Lauretti GR. 1996. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. **Pharmacol. Ther.** 71: 313-324.
- Raasch W, Regunathan S, Li G, Reis DJ. 1995a. Agmatine, the bacterial amine, is widely distributed in mammalian tissues. **Life Sci.** 56: 2319-2330.
- Raasch W, Regunathan S, Li G, Reis DJ. 1995b. Agmatine is widely and unequally distributed in rat organs. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 763: 330-334.
- Raasch W, Muhle H, Dominiak P. 1999. Modulation of MAO activity by imidazoline and guanidine derivates. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 881: 313-331.
- Raasch W, Schafer U, Chun J, Dominiak P. 2001. Biological significance of agmatine, an endogenous ligand at imidazoline binding sites. **Br. J. Pharmacol.** 133: 755-780.
- Raasch W, Schafer U, Qadri F, Dominiak P. 2002. Agmatine, an endogenous ligand at imidazoline binding sites, does not antagonize the clonidine-mediated blood pressure reaction. **Br. J. Pharmacol.** 135: 663-672.
- Raja SN, Meyer RA, Ringkamp M, Campbell JN. 1999. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: Wall PD, Melzack R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone: Londres. 1-8.
- Regunathan S, Feinstein DL, Raasch W, Reis DJ. 1995. Agmatine (decarboxylated arginine) is synthesized and stored in astrocytes. **Neuroreport.** 6: 1897-1900.
- Regunathan S, Youngson C, Raasch W, Wang H, Reis DJ. 1996. Imidazoline receptors and agmatine in blood vessels: a novel system inhibiting vascular smooth muscle proliferation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 276: 1272-1282.

- Regunathan S, Feinstein DL, Reis DJ. 1999. Anti-proliferative and anti-inflammatory actions of imidazoline agents. Are imidazoline receptors involved? **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 881: 410-419.
- Reis DJ, Regunathan S. 2000. Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? **Trends Pharmacol. Sci.** 21: 187-193.
- Reis DJ, Yang XC, Milner TA. 1998. Agmatine containing axon terminals in rat hippocampus form synapses on pyramidal cells. **Neurosci. Lett.** 250: 185-188.
- Ribeiro R A, Vale MV, Thomazzi S.M, Paschoalato ABP, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ. 2000. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur. J. Pharmacol.** 387: 111-118.
- Riedel W, Neeck G. 2001 Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Z. Rheumatol.** 60: 404-415.
- Rodrigues AL, Da Silva GL, Mateussi AS, Fernandes ES, Miguel OG, Yunes RA, Calixto JB, Santos ARS. 2002. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sci.** 70: 1347-1358.
- Ruggiero DA, Regunathan S, Wang H, Milner TA, Reis DJ. 1995. Distribution of imidazoline receptor binding protein in the central nervous system. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 763: 208-221.
- Saegusa H, Kurihara T, Zong S, Kazuno A, Matsumada Y, Nonaka T, Han W, Toriyama H, Tanabe T. 2001. Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking N-type Ca^{2+} channel. **EMBO J.** 20: 2349-2356.
- Saegusa H, Matsuda Y, Tanabe T. 2002. Effects of ablation of N- and R-type Ca^{2+} channels on pain transmission. **Neurosci. Res.** 43: 1-7.

- Sakurada T, Katsumata K, Tan-NO K, Sakurada S, Kisara K. 1992. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonist in the spinal cord. **Neuropharmacology**. 31: 1279-1285.
- Sakurada T, Sugiyama A, Sakurada C, Tanno K, Sakurada S, Kisara K, Hara A, Abiko Y. 1996. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. **Neurochem. Int.** 29: 271-278.
- Sakurada T, Matsumura T, Moriyama T, Sakurada C, Ueno S, Sakurada S. 2003. Differential effects of intraplantar capsazepine and ruthenium red on capsaicin-induced desensitization in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 75: 115-121.
- Santos ARS, Calixto JB. Further evidence for the involvement of tachykinins receptor subtypes on formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides** 31: 381-389, 1997.
- Santos ARS, Vedana EMA, De Freitas GAG. 1998. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflamm. Res.** 47: 302-307.
- Santos ARS, Miguel OG, Yunes RA, Calixto JB. 1999. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 289: 417-426.
- Saper CB, Akil H, Watson SJ. 1986. Lateral hypothalamic innervation of the cerebral cortex: immunoreactive staining for a peptide resembling but immunochemically distinct from pituitary/arcuate alpha-melanocyte stimulating hormone. **Brain Res. Bull.** 16: 107-120.
- Sastre M, Regunathan S, Galea E, Reis DJ. 1996. Agmatinase activity in rat brain: a metabolic pathway for the degradation of agmatine. **J. Neurochem.** 67: 1761-1765.

- Sastre M, Regunathan S, Reis DJ. 1997. Uptake of agmatine into rat brain synaptosomes: possible role of cation channels. **J. Neurochem.** 69: 2421-2426.
- Savinainen JR, Laitinen JT. 2004. Detection of cannabinoid CB1, adenosine A1, muscarinic acetylcholine, and GABA(B) receptor-dependent G protein activity in transducin-deactivated membranes and autoradiography sections of rat retina. **Cell. Mol. Neurobiol.** 24: 243-256.
- Sawamura S, Fujinaga M, Kingery WS, Belanger N, Davies MF, Maze M. 1999. Opioidergic and adrenergic modulation of formalin-evoked spinal c-fos mRNA expression and nocifensive behavior in the rat. **Eur. J. Pharmacol.** 379, 141-149.
- Schultz JJ, Gross GJ. 2001. Opioids and cardioprotection. **Pharmacol. Ther.** 89: 123-137.
- Schwartz D, Peterson OW, Mendonca M, Satriano J, Lortie M, Blantz RC. 1997. Agmatine affects glomerular filtration via a nitric oxide synthase-dependent mechanism. **Am. J. Physiol.** 272: 597-601.
- Segieth J, Pearce B, Fowler L, Whitton PS. 2001. Regulatory role of nitric oxide over hippocampal 5-HT release in vivo. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.** 363: 302-306.
- Shannon HE, Lutz EA. 2000. Effects of the I(1) imidazoline/alpha(2)-adrenergic receptor agonist moxonidine in comparison with clonidine in the formalin test in rats. **Pain.** 85: 161-167.
- Shelley A, Cross MD. 1994. Pathophysiology of pain. **Mayo Clin. Proc.** 69: 375-383.
- Smith JCE, Whitton PS. 2000. Nitric oxide modulates N-methyl-D-aspartate-evoked serotonin release in the raphe nuclei and frontal cortex of the freely moving rat. **Neurosci. Lett.** 291: 5-8.

- Szallasi A, Blumberg PM. 1993. Mechanisms and therapeutic potential of vanilloids (capsaicin-like molecules). **Adv. Pharmacol.** 24: 123-155.
- Tabor CW, Tabor H. 1984. Polyamines. **Annu. Rev. Biochem.** 53: 749-790.
- Tao R, Auerbach SB. 1996. Differential effect of NMDA on extracellular serotonin in rat midbrain raphe and forebrain sites. **J. Neurochem.** 66: 1067-1075.
- Takeshita N, Yamagushi I. 1995. Meta-chlorophenylpiperazine attenuates formalin-induced nociceptive responses through 5-HT_{1/2} receptors in both normal and diabetic mice. **Br. J. Pharmacol.** 116: 3133-3138.
- Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole, K. 1992. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain** 51: 5-17.
- Tjølsen A, Hole K. 1997. Animal Models of Analgesia. In: Dickenson, A., Besson, J., -M., editors. **The Pharmacology of Pain**. Vol.130/I., Springer: Verlag, Berlin. 1-20.
- Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Venter JC, et al. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature.** 388: 539-547.
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D. 1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron.** 21: 531-543.
- Uzbay IT, Yesilyurt O, Celik T, Ergun H, Isimer A. 2000. Effects of agmatine on ethanol withdrawal syndrome in rats. **Behav. Brain Res.** 107: 153-159.

- Vanegas H, Schaible HG. 2000. Effects of antagonists to high-threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia. **Pain**. 85: 8-19.
- Vincent R, Truax JF, Selph JL, Johnston PR. 1979. Antagonism of pain and Hyperalgesia. Anti-inflammatory Drugs. In: Vane, JR, Ferreira, SH, editors. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Vol. 50/II,. Springer: Verlag, Berlin. 208-222.
- Wall PD. 1999. Introduction to the fourth edition. In: Wall PD, Melzack R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone: Londres. 1-8.
- Wang H, Regunathan S, Youngson C, Bramwell S, Reis DJ. 1995. An antibody to agmatine localizes the amine in bovine adrenal chromaffin cells. **Neurosci. Lett**. 183: 17-21.
- Wen ZH, Chang YC, Wong CS. 2003. Implications of intrathecal pertussis toxin animal model on the cellular mechanisms of neuropathic pain syndrome. **Acta Anaesthesiol Sin**. 41: 187-196.
- Weng XC, Gai XD, Zheng JQ, Li J. 2003. Agmatine blocked voltage-gated calcium channel in cultured rat hippocampal neurons. **Acta Pharmacol. Sin**. 24: 746-750.
- Wiech K, Kiefer RT, Topfner S, Preissl H, Braun C, Unertl K, Flor H, Birbaumer N. 2004. A placebo-controlled randomized crossover trial of the N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist, memantine, in patients with chronic phantom limb pain. **Anesth. Analg**. 98: 408-413.
- Wiesinger H. 2001. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. **Prog. Neurobiol**. 64: 365-391.
- Wu WH, Morris DR. 1973. Biosynthetic arginine decarboxylase from *Escherichia coli*: purification and properties. **J. Biol. Chem**. 248: 1687-1695.

- Yamamoto S, Nakao H, Yamasaki K, Takashina K, Suemoto Y, Shinoda S. 1988. Activities and properties of putrescine-biosynthetic enzymes in *Vibrio parahaemolyticus*. **Microbiol. Immunol.** 32: 675-687.
- Yang XC, Reis DJ. 1999. Agmatine selectively blocks the N-methyl-D-aspartate subclass of glutamate receptor channels in rat hippocampal neurons. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 288: 544-549.
- Yesilyurt O, Uzbay IT, 2001. Agmatine potentiates the analgesic effect of morphine by an alpha(2)-adrenoceptor-mediated mechanism in mice. **Neuropsychopharmacology.** 25: 98-103.
- Yu CG, Fairbanks CA, Wilcox GL, Yezierski RP. 2003. Effects of agmatine, interleukin-10, and cyclosporin on spontaneous pain behavior after excitotoxic spinal cord injury in rats. **J. Pain.** 4: 129-140.
- Zheng JQ, Weng XC, Gai XD, Li J, Xiao WB. 2004. Mechanism underlying blockade of voltage-gated calcium channels by agmatine in cultured rat hippocampal neurons. **Acta Pharmacol. Sin.** 25: 281-285.
- Zimmermann M. 1983. Ethical Guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain.** 16: 109-110.
- Zomkowski AD, Hammes L, Lin J, Calixto JB, Santos ARS, Rodrigues ALS. 2002. Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. **Neuroreport** 13: 387-391.
- Zomkowski AD, Rosa AO, Lin J, Santos, ARS, Calixto JB, Rodrigues ALS. 2004. Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant like-effect in the mouse forced swimming test. **Brain Res.** 1023: 253-263.